

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ENERJİ SİSTEMLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**BİYOKÜTLEDEN KARBONİZE İLETKEN ELEKTROT MALZEMESİ ÜRETİMİ
VE BİYOELEKTRONİK UYGULAMALARDA KULLANIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEVKİ FURKAN KÜÇÜKAYAR

TEZ DANIŐMANI

DOÇ. DR. SAMET ŞAHİN

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI

DOÇ. DR. VELİ ŞİMŞEK

BİLECİK, 2023

10512521

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ENERJİ SİSTEMLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**BİYOKÜTLEDEN KARBONİZE İLETKEN ELEKTROT MALZEMESİ ÜRETİMİ
VE BİYOELEKTRONİK UYGULAMALARDA KULLANIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEVKİ FURKAN KÜÇÜKAYAR

TEZ DANIŐMANI

DOÇ. DR. SAMET ŞAHİN

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI

DOÇ. DR. VELİ ŞİMŞEK

BİLECİK, 2023

10512521

BEYAN

“Biyokütleden Karbonize İletken Elektrot Malzemesi Üretimi Ve Biyoelektronik Uygulamalarda Kullanımı” adlı yüksek lisans yeterlik tezi/dönem projesinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	X	DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Destegin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)	X	2021-01. BŞEÜ.01-04	
2- TÜBİTAK			
Diğer.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:	/.....	

Şevki Furkan KÜÇÜKAYAR

.....

Tarih

.....

İmza

.....

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamda bana yol gösteren ve her daim yanımda olan ayrıca tezin yazılma sürecinin hemen hemen her aşamasında katkı sağlayan, tüm bilgi birikimini bana aktaran, bilimsel çalışma tekniğini öğrendiğim ve hayatımın her anında hatırlayacağım danışmanım Doç. Dr. Samet Şahin'e,

Değerli katkıları ve emekleri için Prof. Dr. Zafer Üstündağ, Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan Çağlayan ve Doç. Dr. Veli Şimşek ve değerli jüri üyelerine teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitime başlamamda bana destek olan, her zaman yanımda olan ve tez çalışmam için yardımlarını esirgemeyen can dostum Alper Kemal Gürbüz'e çok teşekkür ediyorum.

Bana her zaman koşulsuz şartsız destek olan, hiçbir zaman fedakarlıktan kaçınmayan ve hayatımın her aşamasında aldığım tüm kararlarda maddi ve manevi olarak destekleyen annem Emel Küçükayar'a, babam Emin Küçükayar'a ve kız kardeşim Efnan Küçükayar'a sonsuz teşekkür ederim.

Şevki Furkan KÜÇÜKAYAR

2023

ÖZET

BİYOKÜTKEDEN KARBONİZE İLETKEN ELEKTROT MALZEMESİ ÜRETİMİ VE BİYOELEKTRONİK UYGULAMALARDA KULLANIMI

Biyosensörler ve yakıt hücreleri biyobelirteçlerin tayini başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Enzimatik biyosensörler ve enzimatik yakıt hücreleri enzimlerin fizyolojik şartlarda çalışabilmeleri, yüksek özgülükleri ve küçük ölçekte tasarım imkânı sağlamaları nedeniyle öne çıkan sistemlerdir. Bu çalışmada, farklı biyokütle kaynakları kullanılarak karbonizasyon yöntemiyle iletken elektrot malzeme hazırlanmış ve elde edilen bu karbonize malzemenin biyoelektronik uygulamadaki performansının incelenmiştir. Bu kapsamda ilk olarak, hasır otu püskülü (TT) ve kedi söğüdünden (PW) karbonizasyon yöntemiyle iletken karbonize malzemeler elde edilmiştir (CTT ve CPW). Elde edilen karbonize malzemeler fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle karakterize edilmiş, baskı devre karbon elektrotlar üzerine kaplanmış ve yüzeylerine glikoz oksidaz enzimi tutuklanmıştır. Daha sonra en uygun enzim tutuklama yöntemi belirlenmiş ve biyosensör çalışma potansiyeli, uygulanan enzim ve mediyatör miktarları optimize edilmiştir. Hazırlanan elektrotlar test edilerek, tekrar edilebilirlikleri, raf ömürleri, girişim etkileri, doğrusal çalışma aralıkları, tayin limitleri (LOD ve LOQ) belirlenmiş ve gerçek numune testleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu elektrotlar platin karası ile geliştirilen katot ile birleştirilerek yakıt hücresi testleri gerçekleştirilmiştir. CTT ve CPW modifiye elektrotların 5 mM glikoz derişimde tekrar edilebilirlik bağıl standart sapma değerleri sırasıyla % 6,67 ve % 12,85 olarak elde edilmiş, 30 günün sonunda akım değişiminin sırasıyla %12,33 ve %19,56 olarak bulunmuştur. Biyosensör, muhtemel girişim yapması beklenen ürik asit, askorbik asit ve insülin varlığında test edildiğinde glikoz cevabına karşı bu maddelerin anlamlı bir girişim etkisi görülmemiştir. Sensörün doğrusal çalışma aralığı her iki malzeme için de 0 – 10 mM olarak belirlenmiş, CTT ve CPW için LOD değerleri ise sırasıyla, 0,45 mM ve 0,31 mM; LOQ değerleri ise sırasıyla 1,35 mM ve 0,93 mM olarak hesaplanmıştır. Biyosensörlerin glikoz tayini için uygulanabilirliği gerçek numune (çilek, vişne ve kayısı reçeli) testleri ile gösterilmiştir. Son olarak, CTT ve CPW ile hazırlanan yakıt hücrelerinden üretilen maksimum güç yoğunluğu değerleri ise sırasıyla 3,54 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ve 3,31 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enzimatik yakıt hücresi, biyokütle, karbonizasyon, biyosensör, biyoelektronik, yenilenebilir enerji

ABSTRACT

PRODUCTION OF CARBONIZED CONDUCTIVE ELECTRODE MATERIAL FROM BIOMASS AND ITS USE IN BIOELECTRONIC APPLICATIONS

Biosensors and fuel cells are used in many applications, especially in the determination of biomarkers. Enzymatic biosensors and enzymatic fuel cells, on the other hand, stand out due to the ability of enzymes to work under physiological conditions, their high specificity, and their miniature design possibilities. This study aims to produce conductive electrode materials using different biomass sources via carbonization and to examine the performance of this carbonized material in bioelectronic applications. First, conductive carbonized materials were obtained from typha tassel (TT) and pussy willow (PW) using the carbonization method (CTT and CPW). The carbonized materials obtained were characterized by physical, chemical, and electrochemical methods, coated on screen-printed carbon electrodes and the glucose oxidase enzyme was immobilized on modified surfaces. The most suitable enzyme immobilization method was determined and the biosensor working potential, applied enzyme, and mediator amounts were optimized. The reproducibility, shelf life, interference effects, linear operating ranges, and detection limits (LOD and LOQ) of the prepared electrodes were determined, and real sample tests were carried out. Then, these electrodes were combined with the cathode developed with platinum black, and fuel cell tests were carried out. The relative standard deviation values of the repeatability of CTT and CPW-modified electrodes at 5 mM glucose concentration were calculated as 6.67% and 12.85%, respectively, and the current change at the end of 30 days was found to be 12.33% and 19.56%, respectively. When the biosensor was tested in the presence of uric acid, ascorbic acid, and insulin, no significant interference effect was observed against the glucose response. The linear operating range of the sensor is determined as 0 – 10 mM for both materials, the LOD values for CTT and CPW are 0.45 mM and 0.31 mM, respectively, and the LOQ values are 1.35 mM and 0.93 mM, respectively. The applicability of biosensors for glucose determination has been demonstrated by real sample (strawberry, cherry, and apricot jam) tests. Finally, maximum power density values obtained from fuel cells prepared with CTT and CPW are 3.54 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ and 3.31 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, respectively.

Keywords: Enzymatic fuel cell; biomass; carbonization; biosensor; bioelectronics; renewable energy

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Biyokütle ve Karbonizasyon.....	4
2.2. Biyosensörler.....	6
2.2.1. Biyosensörlerin özellikleri.....	9
2.2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....	11
2.3. Enzimler.....	12
2.3.1. Enzim Kinetiği.....	14
2.3.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	16
2.4. Enzim Temelli Elektrokimyasal Biyosensörler.....	18
2.4.1. Literatür Taraması.....	19
2.5. Enzimatik Yakıt Hücresi.....	23
2.5.1. Literatür Taraması.....	27
2.6. Modifiye edilen elektrotların karakterizasyonu.....	30
2.6.1. Elektrokimyasal yöntemler.....	30
2.6.2. Karakterizasyon Yöntemler.....	32

3. MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	34
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	35
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	35
3.2. Yöntem.....	37
3.2.1. Biyokütleden Karbonize Malzeme Sentezi ve Karakterizasyonu	37
3.2.2. Karbonize Malzemelerin SPE'lere Kaplanması ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu.....	38
3.2.3. Enzimatik Elektrotların Hazırlanması.....	40
3.2.3.1. SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx Elektrotların Modifikasyonu.....	40
3.2.3.2. SPE/CTT/GOx/Chit ve SPE/CPW/GOx/Chit Elektrotların Modifikasyonu	41
3.2.3.3. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit Elektrotların Modifikasyonu	41
3.2.3.4. SPE/CTT/Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW/Fc/GOx/Chit Elektrotların Modifikasyonu	42
3.2.3.5. Modifiye Edilmiş Elektrotların Glikoz Duyarlılığının Test Edilmesi	43
3.2.4. Modifiye Edilen Elektrotların Optimizasyon Çalışmaları	44
3.2.4.1. Ferrosen Miktarının Optimizasyon Çalışmaları.....	44
3.2.4.2. Glikoz Oksidaz Enzimi Konsantrasyonu Optimizasyon Çalışmaları	44
3.2.4.3. CA Analizi İçin Uygulanacak Potansiyelin Optimizasyonu	44
3.2.5. Modifiye Edilen Biyosensörün Performans Analizleri	45
3.2.5.1. Tekrar Kullanılabilirlik ve Tekrar Üretilirliğin İncelenmesi.....	45
3.2.5.2. Girişim Etkisi.....	45
3.2.5.3. Gerçek Numune Uygulaması.....	45
3.2.5.4. Raf Ömrü	47
3.2.6. Katot Hazırlanması ve Yakıt Hücresi Karakterizasyonu.....	47

4. DENEYSEL SONUÇLAR	50
4.1. Biyokütleden Karbonize Malzeme Sentezi ve Karakterizasyonu	50
4.2. Karbonize Malzemelerin SPE'lere Kaplanması ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	55
4.3. Enzimatik Elektrotların Hazırlanması.....	57
4.3.1. SPE/CTT/GO_x ve SPE/CPW/GO_x Elektrotların Modifikasyonu	57
4.3.2. SPE/CTT/GO_x/Chit ve SPE/CPW/GO_x/Chit Elektrotların Modifikasyonu.	59
4.3.3. SPE/CTT-Fc/GO_x/Chit ve SPE/CPW-Fc/GO_x/Chit Elektrotların Modifikasyonu.....	63
4.3.4. SPE/CTT/Fc/GO_x/Chit ve SPE/CPW/Fc/GO_x/Chit Elektrotların Modifikasyonu.....	65
4.4. Modifiye Edilen Elektrotların Optimizasyon Çalışmaları	66
4.4.1. Glikoz Oksidaz Enzimi Konsantrasyonu Optimizasyon Çalışmaları	67
4.4.2. Ferrosen Miktarının Optimizasyon Çalışmaları	68
4.4.3. CA Analizi İçin Uygulanacak Potansiyelin Optimizasyonu	71
4.5. Modifiye Edilen Biyosensörün Performans Analizleri	74
4.5.1. Tekrar Kullanılabilirliğinin ve Tekrar Üretilirliğin İncelenmesi.....	75
4.5.2. Girişim Etkisi.....	76
4.5.3. Raf Ömrü	77
4.6. Gerçek Numune Uygulaması.....	79
4.7. Katot Geliştirilmesi ve Enzimatik Yakıt Hücresi Karakterizasyonu	81
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	87
5.1. Sonuçlar.....	87
5.2. Öneriler	90
KAYNAKÇA	91

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Biyokütle kullanımının avantaj ve dezavantajları	4
Tablo 2.2. Uluslararası Enzim Sınıflandırması: EC sistemindeki ana enzim sınıfları.	12
Tablo 2.3. Biyosensörler için enzim immobilizasyon yöntemleri.....	17
Tablo 2.4. Enzim ve organik malzeme temelli biyosensörlere örnekler.	21
Tablo 2.5. DET ve MET kullanılan enzimatik yakıt hücrelerinin yapıları ve performans parametreleri *.....	29
Tablo 4.1. 6 mg/mL için karbonize malzemelerin iki farklı çözücünde (Etanol ve DMF) dispersiyonu	55
Tablo 4.2. 10 mg/mL için karbonize malzemelerin iki farklı çözücünde (Etanol ve DMF) dispersiyonu	55
Tablo 4.3. SPE/CPW/GO _x ve SPE/CPW/GO _x /Chit elektrotların 0,1 M PBS tamponunda 4 °C’de saklanırken farklı günler arasındaki akım cevaplarının yüzdesel olarak akım değişimi. 62	62
Tablo 4.4. SPE/CTT/GO _x ve SPE/CTT/GO _x /Chit elektrotların 0,1 M PBS tamponunda 4 °C’de saklanırken farklı günler arasındaki akım cevaplarının yüzdesel olarak akım değişimi. 62	62
Tablo 4.6. SPE/CTT-Fc/GO _x /Chit ve SPE/CPW-Fc/GO _x /Chit elektrotlarının optimum çalışma koşulları ve performans analizleri	78
Tablo 4.7. Standart ekleme ve kalibrasyon yöntemleriyle belirlenen glikoz konsantrasyonu (n=4).....	80

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. (A) Hasırotu ve (B) kedi söğüdü.....	5
Şekil 2.2. Biyokütleden karbonizasyon işlemi ile karbonize malzeme üretimi.....	6
Şekil 2.3. Analiz edilen numune, biyoreseptör, dönüştürücü ve görüntüden oluşan basit bir biyosensörün şematik diyagramı.....	7
Şekil 2.4. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sunulan enzimatik glikoz oksidasyonu mekanizmalarının özeti.....	8
Şekil 2.5. Biyosensörlerin kullanıldığı farklı araştırma alanları.....	10
Şekil 2.6. Biyoreseptörlerin ve dönüştürücülerin farklı kullanımlarına bağlı olarak biyosensörlerin sınıflandırılması.....	11
Şekil 2.7. Bir enzim molekülünün aktif bölgesine bağlanan substratın gösterimi.....	13
Şekil 2.8. Substrat konsantrasyonunun enzim katalizli reaksiyon hızı üzerindeki ilişkisi.....	14
Şekil 2.9. Lineweaver–Burk grafiğinin kullanımı.....	15
Şekil 2.10. İki ana kategoriye ayrılan enzim immobilizasyon yöntemi.....	16
Şekil 2.11. 2016-2022 yılları arasında yayınlanan glikoz biyosensör yayınları.....	19
Şekil 2.12. Çeşitli enerji depolama sistemleri.....	23
Şekil 2.13. Yakıt hücresinin basit şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.14. 2016-2022 yılları arasında yayınlanan EBFC yayınları.....	27
Şekil 2.15. Karbon baskılı elektrotların (SPE) yapısı.....	30
Şekil 3.1. Fiziksel ve kimyasal karakterizasyon için kullanılan (A) SEM/EDX, (B) XRD ve (C) FT-IR cihazları.....	34
Şekil 3.2. Hazırlanan tampon çözeltinin pH ölçümü.....	35
Şekil 3.3. Polimer filmin hazırlanma aşaması.....	36
Şekil 3.4. Test çözeltisinde kullanılan FcCOOH çözeltisinin hazırlama basamakları.....	36
Şekil 3.5. Biyokütle kaynaklarından karbonizasyon yöntemiyle karbon malzeme sentezleme süreci.....	37

Şekil 3.6. Elektrokimyasal karakterizasyon için kullanılan sistem düzeneği	38
Şekil 3.7. Karbonize malzemelerin SPE'lere modifikasyonu ve elektrokimyasal karakterizasyonun şematik gösterimi	38
Şekil 3.8. SPE/CTT/GO _x ve SPE/CPW/GO _x ile modifiye edilmiş elektrotların şematik gösterimi.....	40
Şekil 3.9. SPE/CTT/GO _x /Chit ve SPE/CPW/GO _x /Chit ile modifiye edilmiş elektrotların şematik gösterimi	41
Şekil 3.10. SPE/CTT-Fc/GO _x /Chit ve SPE/CPW-Fc/GO _x /Chit ile modifiye edilmiş elektrotların şematik gösterimi.....	42
Şekil 3.11. SPE/CTT/Fc/GO _x /Chit ve SPE/CPW/Fc/GO _x /Chit ile modifiye edilmiş elektrotların şematik gösterimi.....	43
Şekil 3.12. Modifikasyonu gerçekleştirilen biyosensöre gerçek numune uygulaması	46
Şekil 3.13. Analiz için numunelerin hazırlanması	46
Şekil 3.14. Standart ekleme grafiğinin hazırlanış aşamaları	47
Şekil 3.15. (A) Enzimatik yakıt hücresi için kullanılan sistem düzeneği (B) Enzimatik yakıt hücresi	48
Şekil 4.1. (A) Kedi söğüdü ve (B) Hasır otu.....	50
Şekil 4.2. (A) CPW malzemesine ait geniş açı XRD kırınım diyagramları, (B) CTT malzemesine ait geniş açı XRD kırınım diyagramları, (C) CTT ve CPW malzemelerinin XRD kırınım diyagramları.....	51
Şekil 4.3. 3500-500 cm ⁻¹ spektrum aralığında FTIR analizleri: (A) CPW, (B) RPW ve CPW analiz karşılaştırılması, (C) CTT, (D) RTT ve CTT analiz karşılaştırılması	52
Şekil 4.4. (A) CPW ve (B) CTT'nin SEM görüntüleri ve EDX & Mapping analizi.....	53
Şekil 4.5. Öğütülme işlemi gerçekleştirilen (A) CTT'nin önceki ve sonraki, (B) CPW'nin önceki ve sonraki işlem basamakları gösterilmiştir.	54
Şekil 4.6. (A) CTT'nin SPE'ler üzerine farklı kaplama miktarıyla kaplanması sonucu oluşan CV akım yanıtları gösterilmektedir. Tüm deneyler 50 mV/s tarama hızında FcCOOH ile gerçekleştirilmiştir. (B) SPE ve SPE/CTT kaplı elektrotların elde edilen anodik pik akım değerleri verilmiştir.....	56

- Şekil 4.7.** (A) CPW'nin SPE'ler üzerine farklı kaplama miktarıyla kaplanması sonucu oluşan CV akım yanıtları gösterilmektedir. Tüm deneyler 50 mV/s tarama hızında FcCOOH ile gerçekleştirilmiştir. (B) SPE ve SPE/CPW kaplı elektrotların elde edilen anodik tepe akım değerleri verilmiştir. 56
- Şekil 4.8.** SPE/CTT/GO_x elektrotun (A) CV, (B) CA, (C) kalibrasyon eğrileri ve SPE/CPW/GO_x elektrotun (D) CV, (E) CA, (F) kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CV (tarama hızı: 20 mV/s) ve CA (V = 0,3 (vs Ag/Ag⁺)) analizleri 1 mM FcCOOH içerisinde eklenen farklı glikoz konsantrasyonlarıyla gerçekleştirilmiştir. 58
- Şekil 4.9.** SPE/CTT/GO_x/Chit elektrotun (A) CA, (B) kalibrasyon eğrileri ve SPE/CPW/GO_x/Chit elektrotun (C) CA, (D) kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CA (V = 0,3 (vs Ag/Ag⁺)) analizleri 1 mM FcCOOH içerisinde eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. 59
- Şekil 4.10.** (A) SPE/CTT/GO_x ve SPE/CTT/GO_x/Chit (B) SPE/CPW/GO_x ve SPE/CTT/GO_x/Chit elektrotlarının kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılmıştır. 60
- Şekil 4.11.** (A) SPE/CTT/GO_x, (B) SPE/CTT/GO_x/Chit ve (C) SPE/CPW/GO_x, (D) SPE/CTT/GO_x/Chit elektrotlarının depolama kararlılığı. 5 mM ve 10 mM glikoza verilen yanıtlar, elektrotlar 0,1 M PBS tamponunda 4 °C'de saklanırken farklı günlerde (1, 4 ve 7 gün) izlenmiştir. 61
- Şekil 4.12.** (A) SPE/CTT/GO_x/Chit ve (B) SPE/CTT/GO_x/Chit elektrotlarının raf ömrü. 5 mM ve 10 mM glikoza verilen yanıtlar, elektrotlar 4 °C'de kuru olarak saklanırken farklı günlerde (1, 4, 7, 15 ve 30 gün) izlenmiştir. 63
- Şekil 4.13.** SPE/CTT-Fc/GO_x/Chit elektrotun (A) CA, (B) kalibrasyon eğrileri ve SPE/CPW-Fc/GO_x/Chit elektrotun (C) CA, (D) kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CA (V = 0,3 (vs Ag/Ag⁺)) analizleri 0,1 M PBS içerisinde eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 50 mM'dır. 64
- Şekil 4.14.** SPE/CTT-Fc/GO_x/Chit elektrotun (A) CA, (B) kalibrasyon eğrileri ve SPE/CPW-Fc/GO_x/Chit elektrotun (C) CA, (D) kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CA (V = 0,3 (vs Ag/Ag⁺)) analizleri 0,1 M PBS içerisinde eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 50 mM'dır. 66
- Şekil 4.15.** (A) SPE/CTT ve (B) SPE/CPW ile hazırlanan dört farklı enzimatik elektrotun CA (V = 0,3 (vs Ag/Ag⁺)) sonuçlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. 67

- Şekil 4.16.** SPE/CTT-Fc elektrotunun üzerine tutuklanmış farklı enzim konsantrasyonları ile CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) sonuçlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri. Testler 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 50 mM'dır. **68**
- Şekil 4.17.** (A) SPE/CTT-25 mM Fc, (C) SPE/CTT-50 mM ve (E) SPE/CTT-75 mM elektrotları CV tekniği kullanılarak test edilmiştir. (B), (D) ve (F)'de ise farklı tarama hızları sonucunda elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının karekökü arasındaki ilişki incelenmiştir. CV'ler 0,1 M PBS içerisinde gerçekleştirildi. **69**
- Şekil 4.18.** CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) tekniği kullanılarak (A) 'da SPE/CTT-25 mM Fc/GOx/Chit, (B) 'de SPE/CTT-50 mM Fc/GOx/Chit ve (C)'de SPE/CTT-75 mM Fc/GOx/Chit'in glikoz konsantrasyonlarının akım değişimi. (D) Fc miktarını belirleyebilmek için kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. Testler 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. **70**
- Şekil 4.19.** SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotuna farklı potansiyeller uygulanarak elde edilen kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. CA analizleri 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM'dır. **71**
- Şekil 4.20.** SPE/Fc/GOx/Chit ve SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ile modifiye edilen elektrotların CA ($V = 0,1$ (vs Ag/Ag^+)) sonuçlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. Testler 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM'dır. **72**
- Şekil 4.21.** (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotların akım değişimi ile elde edilen Michaelis-Menten grafiği. CA ($V = 0,1$ (vs Ag/Ag^+)) analizleri ile edilen akım değişimi 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM ve enzim konsantrasyonu 20 mg/mL'dir. **73**
- Şekil 4.22.** (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit enzimatik elektrotların Lineweaver ve Burk grafiği..... **74**
- Şekil 4.23.** (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotun ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CA ($V = 0,1$ (vs Ag/Ag^+)) analizleri 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM'dır. **75**
- Şekil 4.24.** (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotların tekrar üretilebilirliği..... **75**

Şekil 4.25. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotun tekrar kullanılabilirliği	76
Şekil 4.26. Girişim yapan maddelerin (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit sensörlerinin üzerindeki etkisi	77
Şekil 4.27. (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotlarının raf ömrü. 5 mM ve 10 mM glikoza verilen yanıtlar, elektrotlar 4 °C’de kuru olarak saklanırken farklı günlerde (1, 7, 15 ve 30 gün) izlenmiştir. CA ($V = 0,1$ (vs Ag/Ag^+)) analizleri 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM’dir.	77
Şekil 4.28. Ekstra geleneksel (A) vişne, (B) çilek, (C) kayısı reçelleri ve diyabetik (D) vişne, (E) çilek, (F) kayısı reçellerine ait standart ekleme eğrileri	79
Şekil 4.29. SPE/PtB’nin oksijen varlığındaki performansı incelenmiştir. Testler 0,1 M PBS ile LSV tekniği kullanılarak elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. PtB yükleme miktarı 5,6 µL ve malzeme yoğunluğu 1 mg/cm ² ’dir.....	81
Şekil 4.30. Enzimatik yakıt hücresi karakterizasyonunun şematik gösterimi.....	82
Şekil 4.31. (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit anodu, GDE/PtB katodunun ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu, GDE/PtB katodunun potansiyel-akım ve yakıt hücre polarizasyon eğrisi performansları gösterilmektedir. (C) ve (D)’de ise yakıt hücrelerinin performansları karşılaştırılmıştır. Anot kısmında enzim konsantrasyonu olarak 20 mg/mL kullanmış, GDE üzerine 15 µL PtB damlatılmıştır. Testler 0,1 M PBS içerisine eklenen 5 mM glikozla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM’dir.	83
Şekil 4.32. SPE/CTT-Fc/GOx/Chi anodu ve GDE/PtB ile hazırlanmış yakıt hücresinin güç yoğunluğundaki değişim gösterilmektedir. Maksimum güç değerleri 80 kΩ’da elde edilmiştir. SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu ve GDE/PtB ile hazırlanmış yakıt hücresinin güç yoğunluğundaki değişim gösterilmektedir. Maksimum güç değerleri 100 kΩ’da elde edilmiştir. Anot kısmında enzim konsantrasyonu olarak 20 mg/mL kullanmış, katot kısmında ise GDE üzerine 15 µL PtB damlatılmıştır. Testler 0,1 M PBS içinde 5 mM glikozla, 24 °C ±2 sıcaklığında ve nefes alan hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM’dir.	84
Şekil 4.33. Modifiye edilen yakıt hücresini seri bağlama düzeneği	85
Şekil 4.34. SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu GDE/PtB katodu ile hazırlanmış yakıt hücresinin zamanla değişen polarizasyon eğrileri	86

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Ω	: Ohm
μ	: Mikro
A	: Amper
mV/s	: Mili volt/saniye
M	: Molarite
mM	: Milimolar
k_{cat}	: Hız sabiti ya da devir sayısı
SPE	: Baskı devre karbon elektrot
TT	: Hasır otu
PW	: Kedi söğüdü
HTC	: Hidrotermal karbonizasyon
BDCM	: Biyokütle kaynaklı karbonize malzeme
CTT	: Karbonize hasır otu püskülü
CPW	: Karbonize kedi söğüdü
CNT	: Karbon nanotüp
MWCNT	: Çok duvarlı karbon nanotüp
CNANA	: Karbon nanotop aerojelleri
RC	: Yenilenebilir karbon (biyokömür)
H-NPC	: Hibritleştirilmiş nano gözenekli karbon
FT-IR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
XRD	: X ışını kırınımı
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

DMF	: Dimetilformamid
EtOH	: Etanol
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PM	: Prusya mavisi
Fc	: Ferrosen
FcCOOH	: Ferrosenkarboksilik asit
CV	: Döngüsel voltametri
CA	: Kronoamperometri
DPV	: Diferansiyel puls voltametrisi
EIS	: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
SWV	: Kare dalga voltametrisi
LSV	: Doğrusal tarama voltametrisi
EC	: Enzim komisyonu
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
GOx	: Glikoz oksidaz enzimi
DET	: Doğrudan elektron transferi
MET	: Aracılı elektron transferi
[E₀]	: İlk enzim konsantrasyonu
[S₀]	: Substrat konsantrasyonu
K_m	: V _{max} /2 değerine ulaşmak için gerekli substrat miktarı
V_{max}	: Maksimum reaksiyon hızı
Chit	: Kitosan
RSD	: Bağlı standart sapma
AA	: Askorbik asit

- UA** : Ürik asit
- Ins** : İnsülin
- EBFC** : Enzimatik yakıt hücresi
- GDE** : Gaz difüzyonlu karbon elektrot
- PtB** : Platin karası
- OCP** : Açık devre potansiyeli

1. GİRİŞ

Son yıllarda nüfusun artması ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte enerjiye olan talep gittikçe artmıştır. Ayrıca küresel ısınmanın artması da temiz çevre dostu enerji kaynaklarının elde edilmesini ve verimli kullanılmasını gerektirmiştir. Yenilenebilir enerji kaynaklarına yapılan yatırımların ve kullanımının artmasının temel nedeni de budur (Nada vd, 2022). Alternatif veya yenilenebilir enerji biçimleri, geleneksel enerji türlerine ek olarak ortaya çıkmıştır ve bazı gelişmiş ülkelerde enerji üretiminde önemli bir paya sahip olmalarına rağmen bu enerji türleri, enerji sektöründe hala hakkettikleri yeri almamıştır (Maradin, 2021). Günümüz şartları göz önüne alındığında; uygun maliyetli, verimli ve temiz enerji kaynakları son derece önemli hale gelmiştir. Yenilenebilir enerji, sürekli yenilenen doğal süreçlerden elde edilir. Elde edilen çeşitli biçimleri ise; doğrudan güneşten, rüzgârdan, yağmurdan, okyanus gelgitlerinden, biyokütleden ve jeotermalden sağlanmaktadır (Østergaard vd, 2020).

Sürdürülebilirlik kavramı çevresel, ekonomik ve sosyal faktörleri içerir ve enerji alanında disiplinlerarası ilişkisini açıkça gösterir. Enerji sürdürülebilirliğiyle ilgili kaygılar, fosil yakıtların tükenmesi ile ilgilidir (Schirone ve Pellitteri, 2017). Fosil yakıtlar yakıldığında yenilenemeyen bir kaynağı azaltarak karbondioksit (CO₂) dönüştürürken, biyokütlenin yakılması atmosfere yeni CO₂ katkısı sağlamaz (Østergaard vd, 2020). Biyokütle, bu perspektiften bakıldığında yaşam döngüsüne yakın bir yaklaşım sağladığı için en ilginç enerji kaynakları arasındadır (McKendry, 2002). Ayrıca, her yıl tarım, hayvancılık ve insan faaliyetlerinden kaynaklanan milyarlarca metrik ton biyokütle israf edilmekte, bu da biyokütle atıkları ve gereksiz CO₂ emisyonları nedeniyle kirliliğe neden olmaktadır. Bu nedenle, yenilenebilir biyokütle kaynaklarının karbonlu malzemelere dönüştürülmesi için bazı yolların geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir (Z. P. Zhang vd, 2019).

Biyoelektrokimyasal sistemler (BES), kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine çevirebilen ya da tam tersini yapabilen biyokatalitik düzeneklerden yapılmaktadır. BES'ler tipik olarak enzimatik yakıt hücreleri ve mikrobiyal yakıt hücrelerinden oluşmaktadır. BES'de, elektrot malzemeleri elektrokimyasal performansı belirlemede önemli bir parametredir (Herkendell, 2021). Özellikler enzimatik elektrotlar hazırlanırken genellikle altın, karbon nanotüp ve grafen gibi maliyetli ve çevreye zararlı proseslerle üretilen malzemeler kullanılmaktadır. Doğal, ucuz ve kolay bulunabilir olmaları nedeniyle karbon malzemeler en yaygın kullanılan elektrot malzemesidir (Bhat vd, 2019; Gong vd, 2017).

Biyokütle kaynaklı karbonizasyon ürünleri (Biomass-derived carbonaceous materials, BCM), günümüzde çevre-dostu uygulamalarının yanında sensörler, elektronik cihaz elemanı, yeni nesil elektronik malzemeler, ısı eşanjörleri, termal yalıtımlar, biyomalzemeler, elektromanyetik koruyucu, elektrotlar vb. endüstriyel kullanım alanlarına sahiptir (Güleşen vd, 2019; Lin vd, 2021). Karbon temelli elektrot malzemelerin üretiminde, yüksek iletkenlikleri, kararlılıkları ve iyi elektrot yüzey alanlarına sahip olmaları nedeniyle BCM tercih edilmektedir (Erkal vd, 2016; Han vd, 2021). Ayrıca karbon temelli elektrot ve türevleri, nano sensörler, güneş pili, hidrojen depolama, kapasitörler ve biyo-medikal gibi çeşitli teknolojik alanlarda elektro analitik uygulamalara avantajlar sağlamaktadır (Bhat vd, 2019). Özellikle biyosensör ve enzimatik biyoyakıt hücreleri çalışmalarında elektrotların hassasiyetini artırmak ve biyomoleküller için tutuklanma yüzeyi oluşturmak için tercih edilmektedir (Uslu ve Ozkan, 2007).

Elektrokimyasal sistemler, hızlı cevap süreleri, yüksek duyarlılık ve doğruluk sağlamaları nedeniyle hem biyosensörler hem de enzimatik yakıt hücreleri için temel oluşturmuşlardır (L. L. Zhang ve Zhao, 2009). Enzimatik biyosensörler ve yakıt hücreleri fizyolojik şartlarda çalışabilmeleri, yüksek özgülükleri ve küçük ölçekte tasarım imkânı sağlamaları nedeniyle, düşük enerjiyle çalışan elektronik cihazlarda kullanım potansiyeline sahiptir.

Hem elektrokimyasal enzimatik biyosensörler hem de enzimatik yakıt hücrelerinin performansı biyolojik moleküllerin iletken malzemelerin yüzeyleriyle yaptığı güçlü ve kararlı etkileşimlere bağlıdır (Xiao vd, 2019). Bu etkileşimler sonucu yüzeye tutuklanmanın verimi enzimlerin bu yüzeylere nasıl bağlandığı ve kullanılan malzemelerin biyoyuumlulukları ile ilgilidir. Günümüzde enzimlerin performansını ve iletken yüzeylere elektron transferini geliştirici birçok tutuklama yöntemi kullanılmaktadır (Habermüller vd, 2000). Bu yöntemler başlıca adsorpsiyon, kovalent bağlanma ve hapsedme olarak sıralanabilir. Her bir yöntemin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajı olması nedeniyle, kullanılan enzim, enzimin bağlanacağı yüzey ve gerçekleşecek enzimatik reaksiyona göre kullanılan yöntemler her sistem için farklılık gösterebilmektedir (Datta vd, 2013). Glikoz oksidaz (GOx), enzimatik sensörlerde kullanılan en yaygın enzimdir (Wilson ve Turner, 1992). İlk olarak 1964 yılında ortaya çıkan enzimatik yakıt hücreleri günümüze kadar gelişimini sürdürmeye devam etmiştir (Yahiro vd, 1964). Bu hücrelerde, yakıtın (substrat) anotta enzimatik oksidasyonu sonucu açığa çıkan elektronlar elektronik bir devreyle katoda ulaşır ve burada meydana gelen enzimatik indirgenme reaksiyonuyla (genellikle oksijen indirgenmesi) ürün oluşur (genellikle su) (Leech vd, 2012;

Mekhilef vd, 2012; Xiao vd, 2019). Böylece iki elektrot arasında (anot ve katot) bir potansiyel fark elde edilir.

Elektrokimyasal biyosensörler, basit kullanım, yüksek hassasiyet ve seçicilik nedeniyle sıklıkla araştırılmaktadır (Hovancová vd, 2017) ve enzimatik veya enzimatik olmayan elektrokimyasal biyosensörler olmak üzere iki temel grupta incelenebilir (Leech vd, 2012). Enzimatik biyosensörler, mükemmel seçicilikleri ve duyarlılıkları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimatik olmayan sensörlerde ise herhangi bir biyolojik molekül kullanılmadan elektrokimyasal biyosensörler geliştirilmektedir (Mohammadpour-Haratbar vd, 2022). Bu tip sensörlerde, platin, altın ve bakır olmak üzere farklı metaller, günümüzde ise daha çok nanomalzemeler tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında, yaygın olarak bulunan ucuz biyokütle malzemelerin katma değere sahip değerli ürünlere dönüştürülmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, farklı biyokütle kaynaklarından, piroliz yöntemiyle karbonize iletken elektrot malzemeleri elde edilmiş ve bu malzemelerin biyoelektronik uygulamalardaki performansları incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, biyokütle kaynaklı karbonize iletken malzemelerle modifiye edilmiş elektrotlara enzim tutuklanarak biyosensör ve biyo-yakıt hücrelerindeki performansı test edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyokütle ve Karbonizasyon

Enerji ihtiyacını karşılamak için kullanılan fosil yakıtların sınırlı kaynak, hızlı tüketim ve çevresel zararları nedeniyle verimli, çevreci ve sürdürülebilir enerji depolama sistemlerini keşfetmek ve geliştirmek gerekmektedir. Enerji depolama sistemlerinde kullanılan elektrot malzemesi elektrokimyasal performansı belirlemede anahtar parametredir. Düşük maliyeti, kararlılığı, sürdürülebilirliği ve çevre dostu olması nedeniyle elektrot malzemesi olarak karbon malzemeler yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda, elektrot malzemesi olarak yenilenebilir biyokütle kaynaklı karbon malzemeleri kullanılmaktadır (Gong vd, 2017).

Biyokütle, dünya çapında hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ekonomiler için modern toplumun enerji ihtiyaçlarına katkıda bulunma potansiyeli en yüksek yenilenebilir enerji kaynağı olarak kabul edilmektedir (Bridgwater, 2006). Biyokütle, enerji kaynağı olarak kullanılabilen herhangi bir organik maddeye denir ve yakıldığında depolanan enerji ısı veya elektrik üretmek için kullanılabilir. İnsanlar yüzyıllardır biyokütleyi odun yakarak evlerini ısıtmak için ya da yemek pişirmede kullanmışlardır. En çok kullanılan biçimleri arasında tarımsal ürünler, ürün artıkları ve orman ürünleri bulunmaktadır. (Clarke ve Preto, 2011; Energy, 2016).

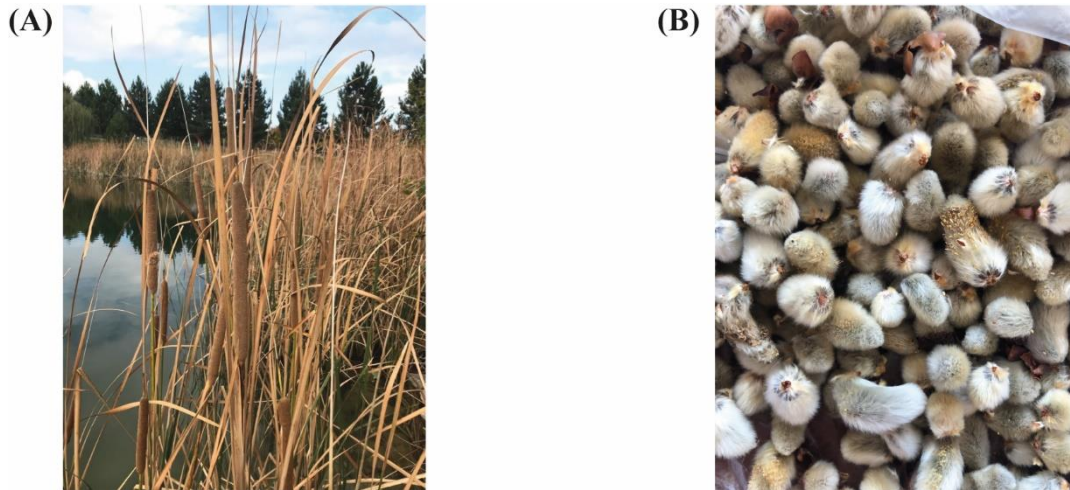
Tablo 2.1. Biyokütle kullanımının avantaj ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
Yenilenebilir, sürdürülebilir ve temiz bir enerji kaynağıdır.	Aşırı kullanımı bitki tahribatına yol açabilir ve küresel ısınmayı etkiler.
Isı ve elektrik gibi farklı enerji kaynaklarını karşılamak için kullanılabilir.	Yoğunluğu düşük olduğu için taşıma maliyetleri fazladır.
Genelde atıklar kullanıldığı için ucuz bir enerji kaynağıdır.	Lifli bir yapıya sahip oldukları için ezilmesi ve öğütülmesi zordur.

Tablo 2.1'de biyokütle kullanımının avantaj ve dezavantajları detaylı olarak incelenmiştir. Biyokütlenin yeryüzünde bol miktarda bulunması, yenilebilir bir enerji kaynağı olması, her yerde yetişebildiği için özellikle kırsal bölgelerin sosyoekonomik olarak kalkınması için önemli bir enerji kaynağıdır (Stevanovic ve Stevanovic, 2022). Ayrıca son yıllarda enerji

depolaması için sürdürülebilir ve yüksek performanslı biyokütle kaynaklarından üretilen elektrot malzemeleri ile ilgili önemli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (L. X. Zhang vd, 2015). Elektrot malzemeleri arasında karbon; yüksek iletkenlik, düşük maliyet, geniş yüzey alanı gibi özellikler sunar ve enerji depolama cihazları için önemlidir. Biyokütleden elde edilen karbonun, sürdürülebilir ve yenilenebilir sürecinin yanı sıra ticari perspektifi ve atık geri dönüşüm açısından oldukça önemlidir. Karbon temelli elektrotların gözenekli yapı, yüksek yüzey alanı ve elektrik iletkenliği gibi özellikleri elektrokimyasal performansını arttırmak için anahtar parametrelerdir (Chang vd, 2021; Jin vd, 2018).

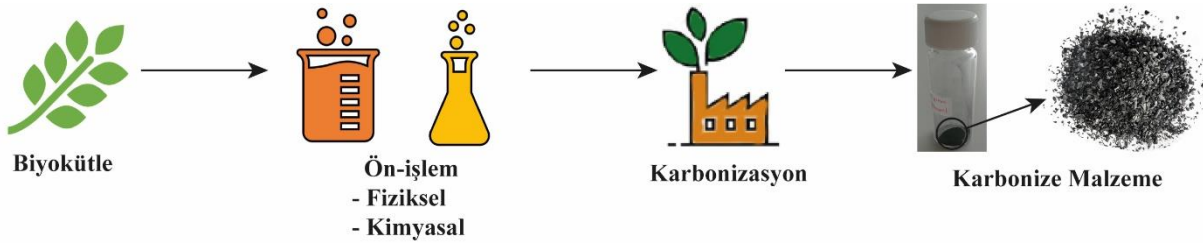
Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında karbonize elektrot malzeme üretimi için hammadde olarak hasır otu ve kedi söğüdü seçilmiştir. Hasırotu ve kedi söğüdü, sulak alanlarda ve çevresinde bulunabilir ayrıca düşük maliyetlidir. Hızlı büyümesi nedeniyle çevre kirliliğine neden olabilir (Shen vd, 2019). Güneş enerjisini etkin bir şekilde kullanır ve tohumları rüzgârla savrulup sonra su yüzeyinde yüzdüğü için hızla yayılan lignoselülozlardan oluşur (Anisuzzaman vd, 2015; Labrecque ve Teodorescu, 2003). Genelde biyokütle lignoselülozik biyokütle olarak adlandırılan bitkileri veya bitki türevli malzemeleri ifade eder (L. X. Zhang vd, 2015). Lignoselülozik biyokütle, dünya üzerinde bulunan en bol yenilenebilir biyolojik kaynaktır (Şahin vd, 2018).



Şekil 2.1. (A) Hasırotu ve (B) kedi söğüdü

Biyokütlelerin karbonizasyonundan elde edilen katı maddeye karbonize malzeme denir. Karbonize malzeme üretmek için seçilen hammaddenin karbon içeriğinin yüksek olması gerekir. Bitkisel kaynak seçme sebebimiz de buna dayanmaktadır. Karbonizasyon, inert gaz (N_2 gibi) varlığında hafif hidrokarbonlar ve hidrojen şeklindeki uçucu maddeleri uzaklaştırarak biyokütlenin karbon bileşimini zenginleştirmek için yapılan bir termal bozundurma işlemidir.

Karbon malzemelerin sentezi ve uygulanması uzun bir geçmişe sahiptir ve karbon siyahı 3000 yıldan fazla bir süredir mürekkep, pigmentler ve dövme için kullanılmaktadır (Hu vd, 2010). Çeşitli karbon türleri arasında karbon nanotüplerin (CNT'ler) 1991'de gözlemlenmesinden bu yana karbonize malzemelerin elektrot malzemesi için ideal bir aday olduğunu düşünülmektedir (H. Li vd, 2011). Bununla birlikte CNT ve grafen gibi karbon malzemelerin maliyeti yüksektir ve uygulamada kullanımını sınırlar. Bu malzemelere kıyasla karbonize malzemelerin karşılaştırılabilir yüksek yüzey alanlarına ve gözenekli yapılarına sahip olmasının yanında maliyeti çok daha düşüktür (J. L. Wang ve Wang, 2019). Yüksek yüzey alanlı karbonize malzemeler, enerji depolama cihazlarında en çok kullanılan malzemelerdir; karbonun geniş yüzey alanı, elektrot/elektrolit ara yüzünde yük biriktirme kapasitesini artırmaya yardımcı olabilir. Ayrıca, oksidasyon kararlılığı ve yüksek özgül iletkenlikler (Omik kayıpları ve ısıyı azaltmak için) gibi özellikler önemli geliştirme parametreleridir (Zhao vd, 2010).



Şekil 2.2. Biyokütleden karbonizasyon işlemi ile karbonize malzeme üretimi

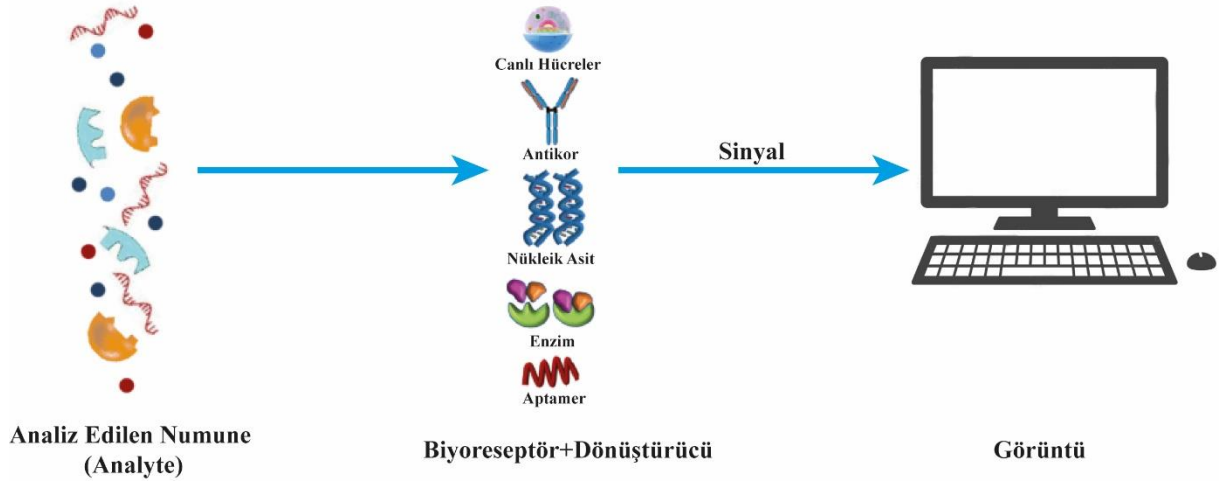
2.2. Biyosensörler

Biyosensör, temel olarak bir biyolojik tanıma bölgesi (biyoreseptör), özel bir transdüser (dönüştürücü) ve sinyal işleme kısmından oluşur. Bir biyosensör bağlı veya entegre edilmiş bir biyolojik algılama elemanına sahip cihazdır. Amaç, belirli bir kimyasalın veya bir dizi kimyasalın konsantrasyonuyla orantılı olan dijital elektronik sinyal üretmektir ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesiyle ilgilidir. Biyosensör cihazları spesifik, hızlıdır, çalıştırılması kolaydır ve minimum numune ön işleme dâhil edilerek kolaylıkla üretilebilir. Şekil 2.3'de görüldüğü gibi tipik bir biyosensör analiz edilen numune, biyoreseptör, dönüştürücü ve görüntüden oluşur (Mohd Said, 2014).

Analit: Bileşenleri tanımlayan veya belirleyen madde (Örn. glikoz, amonyak ve laktöz).

Biyoreseptör: Hedef substratı (yani bir analiti) tanıyabilen bir biyomolekül veya biyolojik bir element, biyoreseptör olarak bilinir (örneğin, enzimler, hücreler, aptamerler, nükleik asit (DNA veya RNA) ve antikörler). Biyoreseptör ve analit arasındaki etkileşim sırasında sinyal üretim sürecine biyotanıma denir.

Dönüştürücü: Enerjiyi bir biçimden diğerine dönüştüren bir cihazdır. Dönüştürücü, bir biyosensörde anahtar unsurdur. Biyolojik tanıma olayını, kimyasal veya biyolojik bir hedefin miktarı veya varlığında ölçülebilir bir sinyale dönüştürür. Bu enerji dönüştürme işlemi sinyalizasyon olarak bilinir. Dönüştürücüler, analit-biyoreseptör etkileşimlerinin sayısıyla orantılı olarak optik veya elektriksel sinyaller üretir. Çalışma prensibine göre dönüştürücüler genel olarak elektrokimyasal, optik, termal ve elektronik sınıflandırılır.

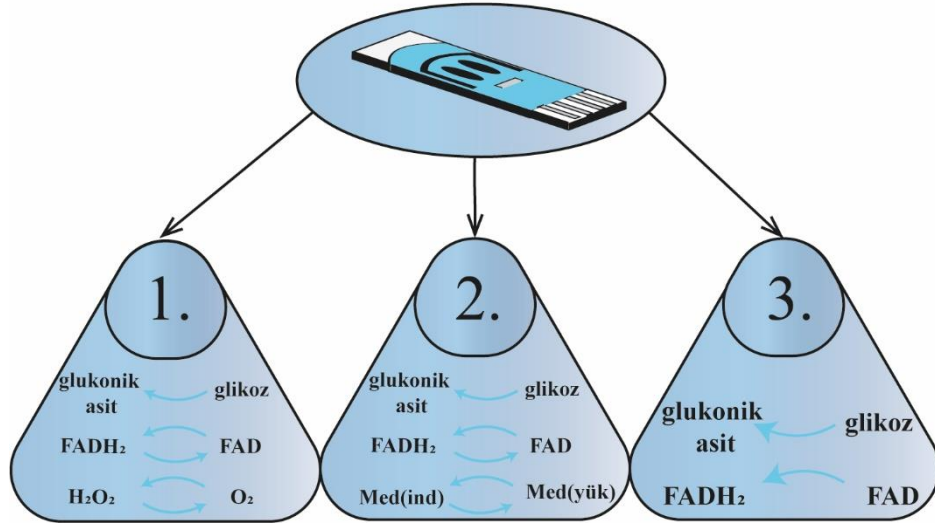


Şekil 2.3. Analiz edilen numune, biyoreseptör, dönüştürücü ve görüntüden oluşan basit bir biyosensörün şematik diyagramı.

Görüntüleme: Görüntü birimi, karşılık gelen yanıtın kullanıcı tarafından okunabilmesi ve anlaşılabilmesi için çıktı üreten bir bilgisayar gibi kullanıcı yorumlama sisteminden oluşur. Son kullanıcı ön koşuluna bağlı olarak, çıktı sayısal, grafik, tablo değeri veya bir şekil biçiminde olabilir (Naresh ve Lee, 2021).

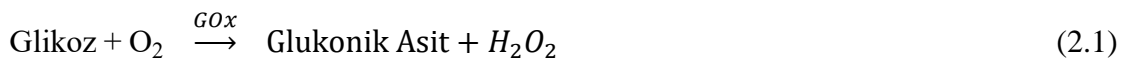
Glikoz temelli biyosensörlerin evrimi, bileşenlerin bağlanmasına, yani biyotanıma elemanının (biyoreseptör) dönüştürücüye uyum yöntemine göre üç nesilden oluşmaktadır. Glikoz seviyesini ölçmek için ilk enzim temelli elektrot 1962'de Clark ve Lyons tarafından tanıtılmıştır. Bundan sonra, enzim temelli glikoz biyosensörlerinin gelişimi üç nesilden geçmiştir; birinci nesil, enzimatik reaksiyonun sarf malzemesi olan doğal oksijenin kullanılmasına ve reaksiyonunun sonucunda ortaya çıkan H_2O_2 'nin saptanmasına dayanmaktadır. Bununla birlikte, oksijen difüzyonu ve aşırı potansiyel uygulanması GOx 'in H_2O_2 üretme yeteneğini sınırlamaktadır. İkinci nesil biyosensörlerde bu sınırlama elektronları enzimden çalışma elektrotunun yüzeyine taşımak için redoks araçları kullanılmasını gerektirir. Çünkü doğrudan elektron transferini engelleyen bir enzim yapısı mevcuttur. Bu nedenle, enzim ve elektrot arasında doğrudan elektron transferine izin vererek aracıyı ortadan kaldıran üçüncü

nesil bir glikoz biyosensörü geliştirilmiştir (Jayakumar vd, 2021; Tinikul vd, 2022). Üçüncü nesil ise, yapay araçlardan kurtulmak amacıyla geliştirilmiştir. GOx, düşük maliyeti ve yüksek seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle ticari olarak mevcut glikoz sensörlerinin çoğunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu vd, 2022). GOx'e dayalı amperometrik enzim elektrotları, basit kullanımı kolay kan şekeri testine geçişte öncü bir rol oynamıştır ve sürekli glikoz izlemede benzer bir rol oynaması beklenmektedir (Joseph Wang, 2008). Şekil 2.4'de biyosensörlerin üç nesli gösterilmiştir (C. Chen vd, 2013).



Şekil 2.4. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sunulan enzimatik glikoz oksidasyonu mekanizmalarının özeti.

Birinci nesilde, biyosensörler, dönüştürücünün yüzeyine yayılan ve bir elektrik yanıtı üreten biyoreseptör reaksiyonlarının analitlerinin ve ürünlerinin içeriğini ölçer. Bu tür sensörlere aracısız amperometrik biyosensörler de denir. Biyosensörlerin babası olarak nitelendirilen Clark ilk raporunda biyosensörün bileşenlerini tanımlamıştır. 1956 yılında yayınlanan rapor, kandaki oksijen konsantrasyonunu ölçebilen bir elektrot hakkındaydı (Naresh ve Lee, 2021). 1962'de Clark ve Lyons tarafından üretilen ilk glikoz enzim elektrotu, denklem (2.1)'de gösterildiği gibi O_2 varlığında glikoz oksidasyonu gerçekleşerek kandaki glikoz miktarı geliştirilen cihazla tespit edilmiştir (Clark Jr ve Lyons, 1962; Naresh ve Lee, 2021).



Bu reaksiyona bağlı olarak hidrojen peroksit konsantrasyonundaki artış ve oksijen konsantrasyonundaki azalma, her ikisi de glikoz konsantrasyonu ile orantılı olmak üzere elektrokimyasal olarak tespit edilir (Atanasov ve Wilkins, 1994). İkinci nesilde, yardımcı

enzimler ve nanomalzemeler gibi ayrı ayrı bileşenler, analitik verimliliği artırmak amacıyla biyosensörün biyolojik bileşen katmanına entegre edilir. Bu tür sensörlere aracı amperometrik biyosensörler de denir.

Üçüncü nesilde, biyoreseptör molekülü, temel algılama elemanının ayrılmaz bir parçası haline gelir, yani biyosensörler, elektrolit içinde serbest bulunan difüzyon araçları yerine aynı elektrot üzerinde enzimler ve araçlar kullanmıştır. Ara aşamalara ihtiyaç duymadan elektron transferi yoluyla enzimler ve elektrot arasında doğrudan bir etkileşim kurulmuştur. Etkileşimin yanı sıra, düşük tasarım maliyeti ve tekrarlanan ölçümlere sahip olma olasılığı, üçüncü nesil biyosensörün avantajlarıdır (C. Chen vd, 2013; Naresh ve Lee, 2021).

2.2.1. Biyosensörlerin özellikleri

Her biyosensörün sahip olduğu özellikler vardır ve bu özellikler biyosensörün performansına yansımaktadır. Bu özellikler kullanılarak biyosensörlerin performansı optimize edilebilir.

Seçicilik (Selectivity): Biyosensörün bir biyoreseptör seçerken dikkate alınması gereken en önemli özelliğidir. Seçiciliğin en güzel örneği bir antijenin antikolar ile etkileşimi olarak gösterilir (Bhalla vd, 2016).

Tekrar üretilebilirlik (Reproducibility): Tekrar üretilebilirlik, biyosensördeki dönüştürücünün ve görüntülemenin kesinliği (bir numune her ölçüldüğünde benzer sonuçlar çıkması) ve doğruluğu (bir numune birden fazla kez ölçüldüğünde sensörün gerçek değere yakın bir ortalama değer sağlama kapasitesi) ile karakterize edilir. Tekrar üretilebilirlik, biyosensörün, aynı numune ölçüldüğünde aynı sonuçları üretmesidir ve tekrar üretilebilir sinyaller, bir biyosensörün yanıtı üzerinde yapılan çıkarımda yüksek güvenilirlik ve sağlamlık sağlar (Bhalla vd, 2016).

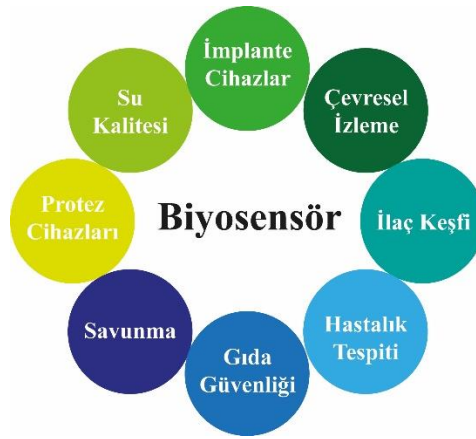
Stabilite (Stability): Stabilite (kararlılık), biyosalgılama sistemindeki ve çevresindeki ortam bozukluklarına karşı duyarlılık derecesidir. Biyosensörün uzun inkübasyon adımları veya sürekli izleme gerektirdiği uygulamalarda stabilite en önemli özelliktir (Bhalla vd, 2016).

Doğrusallık (Linearity): Doğrusallık, matematiksel olarak “ $y=mx$ ” olarak gösterilen düz bir çizgiyle ölçülen yanıtın doğruluğunu gösteren özelliktir; burada x , analitin konsantrasyonu, y çıkış sinyalidir ve m biyosensörün hassasiyetidir. Uygulamaya bağlı olarak, çoğu biyosensör uygulaması yalnızca analit tespitini değil, aynı zamanda geniş bir çalışma aralığında analit konsantrasyonlarının ölçümünü de gerektirir. İlişkili başka bir terim ise,

biyosensör yanıtının konsantrasyonla doğrusal olarak değiştiği analit konsantrasyonlarının aralığı olarak tanımlanan doğrusal aralıktır (Bhalla vd, 2016).

Duyarlılık (Sensitivity): Biyosensör tarafından tespit edilen minimum analit miktarını (LOQ), tespit sınırını (LOD) veya hassasiyetini tanımlar. Numunede analit izlerinin varlığını doğrulamak için az miktardaki analit miktarlarını düşük konsantrasyonlarda doğru şekilde saptamak önemli bir biyosensör özelliğidir.

Biyosensörler, yaşam kalitesini artırmayı amaçlayan çok geniş uygulama alanlarına sahiptirler. Şekil 2.5'te görüldüğü üzere biyosensörlerin; çevresel izleme, hastalık tespiti, gıda güvenliği, savunma, ilaç keşfi ve daha pek çok alanda kullanımları mevcuttur. Çevre kirliliği sorunu uzun süredir çok önemli bir konudur. Birçok araştırmacı hızlı, çevrimiçi, sürekli izleme ekipmanı elde etmek için çalışma yapmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler ise bu konuda önemli adaylardır.

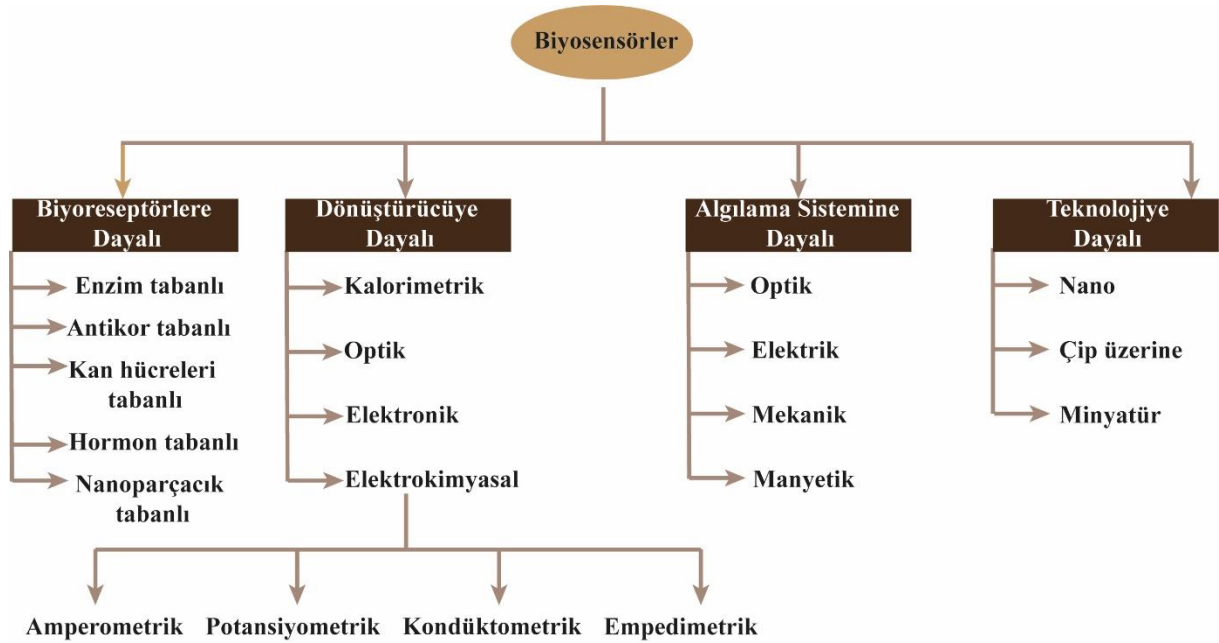


Şekil 2.5. Biyosensörlerin kullanıldığı farklı araştırma alanları.

Biyosensörlerin ana uygulamalarından biri, bir hastalığın göstergesi veya bir ilacın hedefi olan biyomoleküllerin tespitidir. Elektrokimyasal sensörler, basit kullanım, yüksek hassasiyet ve seçicilik nedeniyle önemli bir biyomedikal araştırma aracı haline gelmiştir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan popüler gıda katkı maddelerinden biri de diş çürüğü, kalp-damar hastalıkları, obezite ve tip-2 diyabet gibi istenmeyen hastalıklara neden olan tatlandırıcılardır. Yapay tatlandırıcıların bağımlılık yaptığına ve bilinçsizce bizi daha yüksek enerjili yiyecekler yemeye ikna ederek, kontrolsüz kilo alımına neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bunların saptanması ve miktarının belirlenmesi çok önemlidir (Mehrotra, 2016). Biyosensörler ayrıca gıda izlenebilirliğini, kalitesini, güvenliğini ve besin değerini izlemek Enzim elektrot temelli biyosensör bal, elma suyu, reçel ve şarap arasındaki glikoz içeriğini ölçebilir (Xiang, 2011).

2.2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Sensörler, algılanacak bileşenlerine veya analitlerine göre birkaç kategoriye ayrılabilir. Biyosensörlerin sınıflandırılmasında çeşitli ölçütler yer almaktadır ve ana hatlarıyla sınıflandırma şeması Şekil 2.6'da gösterilmektedir (Kulkarni vd, 2022).



Şekil 2.6. Biyoreseptörlerin ve dönüştürücülerin farklı kullanımına bağlı olarak biyosensörlerin sınıflandırılması.

Biyoreseptörler, biyosensör yapımında birincil bileşen olarak kabul edilir. Biyoreseptöre bağlı olarak, biyosensörler enzimatik biyosensörler (en yaygın biyosensör sınıfı), immünosensörler (yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahiptir ve özellikle teşhiste yararlıdır), aptamer veya nükleik asit temelli biyosensörler ve mikrobiyal veya tam hücre biyosensörleri olarak sınıflandırılır.

İkinci sınıflandırma dönüştürücü temelinde yapılır ve sensörler elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, empedans ve kondüktometrik olarak gruplandırılır), elektronik biyosensör, termal biyosensör, optik ve kütle temelli olarak kategorize edilir. Diğer bir sınıflandırma ise sınırlı sayıda olan biyoreseptör-analit kombinasyonlarını içermektedir. Bazı sınıflandırmalar tespit sistemine (optik, elektrik, elektronik, mekanik ve manyetik) ve teknolojiye (nano, çip üzerinde biyosensörle ve konuşlandırılabilir) bağlı olarak yapılmaktadır (Kulkarni vd, 2022).

Enzimatik biyosensör ve yakıt hücresinin verimli çalışabilmesi için bazı koşulları sağlaması gerekir. İlk olarak, enzim ucuz, yüksek katalitik aktiviteye ve stabiliteye sahip olmalıdır. Yakıt hücrelerinde, anot ve katot arasındaki maksimum potansiyel farkını elde edebilmek için anodun redoks potansiyeli olabildiğince negatif olmalıdır. Üçüncüsü, enzimden elektrot yüzeyine sürekli ve verimli elektron transferi için bir aracı kullanmak ve enzim immobilizasyon yöntemi geliştirmek gerektirir (Ivnitski vd, 2006).

2.3. Enzimler

Enzimler genellikle katalizör görevi gören yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Enzim kelimesi ilk kez 1878 yılında Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından mayanın şekerden alkol üretme yeteneğini tarif ederken kullanılmıştır. Ortam koşulları altında kimyasal olarak kataliz edilen reaksiyonlara kıyasla çok daha yüksek reaksiyon hızlarıyla sonuçlanan spesifik, çok yönlü ve etkili biyolojik katalizörlerdir (biyokatalizörler olarak da bilinirler) (Shuler vd). Örneğin; GOx, substratı olan β -D-glikoz için neredeyse tamamen özgüllük gösterir ve diğer monosakkaritlerle neredeyse hiç aktivite göstermez. Bu özgüllük, karmaşık bir karışımdaki (Örn: bir kan veya idrar numunesi) belirli bir substratı (Örn: glikoz) ölçen birçok analitik deneyde ve cihazda (biyosensörler) büyük önem taşır (Robinson, 2015).

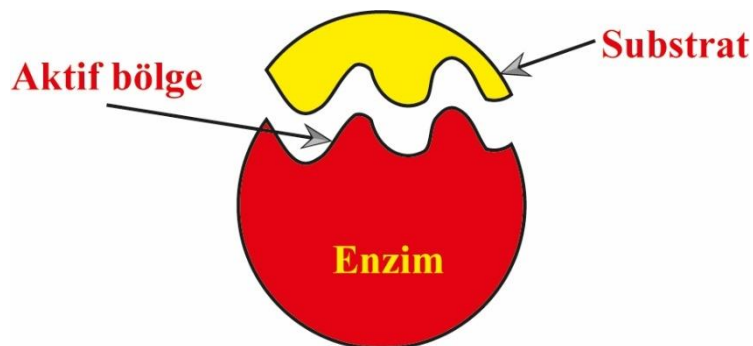
Tablo 2.2. Uluslararası Enzim Sınıflandırması: EC sistemindeki ana enzim sınıfları.

İlk EC hanesi	Enzim sınıfı	Reaksiyon tipi
1.	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon/redüksiyon
2.	Transferazlar	Atom/grup transferi
3.	Hidrolazlar	Hidroliz
4.	Liyazlar	Kimyasal bağların ayrılması
5.	İzomerazlar	İzomerizasyon
6.	Ligazlar	İki molekülün kovalent bağlanması

Enzimlerin isimlendirilmesindeki karmaşıklık sebebiyle, bu konunun ele alınması için Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından Enzim Komisyonu kurulmuştur. İlk Enzim Komisyonu Raporu 1961'de yayınlanmıştır ve enzimlerin adlandırılmasına sistematik bir yaklaşım sağlanmıştır. Bu sistem içerisinde, tüm enzimler dört haneli bir Enzim Komisyonu (EC) numarası ile tanımlanır (Robinson, 2015; Shuler vd). Enzimler substrata özeldir ve katalize ettikleri reaksiyona göre sınıflandırılır. Başlıca enzim sınıfları ve işlevleri Tablo 2.2'de listelenmiştir (Robinson, 2015).

Enzimlerin muazzam katalitik aktivitesi, hız sabiti ya da dönüşüm sayısı k_{cat} ile ifade edilebilir. Bu sabit, birim zamanda (genellikle dakikada veya saniyede) tek bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülebilen substrat moleküllerinin sayısını temsil eder. Enzimler, substratı bağlayarak ve bir enzim-substrat kompleksi oluşturarak katalize edilen reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürür. Enzimler, serbest enerji değişimini veya denge sabitini etkilemez.

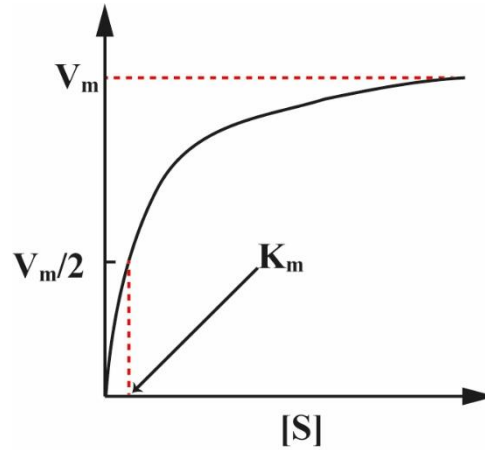
Enzim özgülüğünün, substratın ve aktif bölgesinin tamamlayıcı doğasından kaynaklandığı hipotezi, ilk olarak 1894 yılında Alman kimyager Emil Fischer tarafından önerildi ve "kilit ve anahtar hipotezi" olarak tanındı. Bu hipotez, Şekil 2.7'de görüldüğü gibi kilidin (enzim) anahtar deliğine (aktif bölge) yalnızca doğru boyut ve şekildeki (ürün) bir anahtarla takılabileceğini anlatıyordu. Bu bilgiler ışığında, 1958'de Daniel Koshland, Fischer'in fikirlerini genişletti ve substrat ve enzim bağlanmasının 'indüklenmiş uyum modelini' sundu. Enzimlerin, daha esnek yapılar olduğu bulgusundan yola çıkarak ortaya çıkan ve enzim moleküllerinin substrata bağlanmak için şeklini hafifçe değiştirdiğini anlatmaktadır. Örneğin, benzer şekillere sahip olan el ve eldivenin birleştiklerinde eldivenin elin şekline tam oturarak mükemmel bir uyum oluşturmasıdır (Robinson, 2015; Shuler vd).



Şekil 2.7. Bir enzim molekülünün aktif bölgesine bağlanan substratın gösterimi.

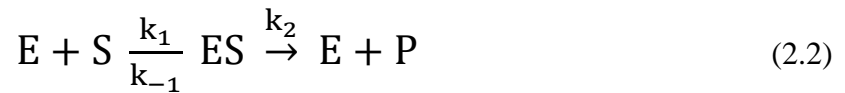
2.3.1. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği, enzim katalizli reaksiyonların hızını belirleyen faktörlerin incelenmesidir. Şekil 2.8’de enzim katalizli bir reaksiyonda zamanla ürün oluşumuna ait bir grafik verilmiştir. Grafikte reaksiyon hızının zamanla yavaşlamasının nedeni karışım içindeki substratın tüketilmesi ve dolayısıyla sınırlayıcı hale gelmesidir. Alternatif olarak, enzim kararsız olabilir ve deney boyunca denatüre olabilir veya birçok reaksiyon proton tükettiği için karışımın pH’ı değişiyor olabilir. Bu sınırlamaların hiçbiri geçerli olmadığında reaksiyonun hızı daha fazla enzim eklenmeden hızlı bir reaksiyon elde edilemez (Robinson, 2015).



Şekil 2.8. Substrat konsantrasyonunun enzim katalizli reaksiyon hızı üzerindeki ilişkisi.

Denklem 2.2 tek substratın ürüne dönüştüğü enzimatik bir reaksiyon için yazılabilecek en basit denklemlerden birisidir. Basit enzim katalizli reaksiyonların kinetiği genellikle “Michaelis-Menten Kinetiği” veya “Doyma Kinetiği” olarak adlandırılmaktadır.



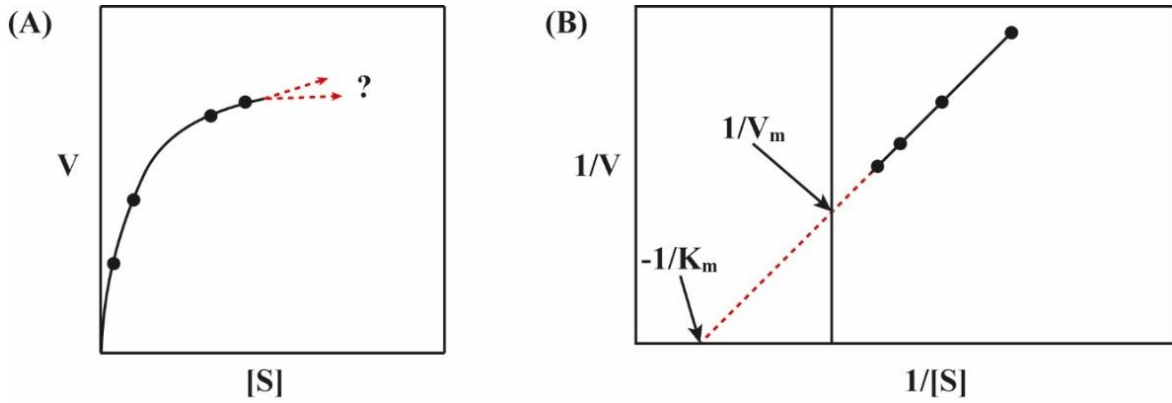
Bu matematiksel model ilk olarak 1902’de Henri ve 1913’te Michaelis ve Menten tarafından geliştirildi. Genellikle, ilk hız deneyleri yapılarak veriler toplanır. Örneğin; kesikli reaktöre ilk enzim konsantrasyonu ($[E_0]$) ve substrat konsantrasyonu ($[S_0]$) koyulur ve zamana karşı ürün oluşumu grafiği elde edilir. Bir enzim çözeltisi, substratların bağlanabileceği sabit sayıda aktif bölgeye sahiptir. Yüksek substrat konsantrasyonlarında, tüm bu alanlar substratlar tarafından işgal edilebilir veya enzim doymuştur (Shuler vd).

$$V_{\text{maks}} = k_2 [E_0] \text{ ve } K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.3)$$

Böylece Michaelis-Menten denklemi olarak adlandırılan son denklemi aşağıdaki gibi elde edilebilir:

$$V_0 = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{[S] + K_m} \quad (2.4)$$

V_{maks} , tüm enzimlerin substrat ile bağlandığı durumdaki elde edebilecek maksimum hızı verir. Dolayısıyla daha fazla enzim eklenmeden daha hızlı bir reaksiyon elde edilemez. Denklemden de görüleceği üzere sadece ilk enzim konsantrasyonuyla değişebilir. Substrat miktarı sonsuza doğru gittiğinde reaksiyon hızı V_{maks} 'a yaklaşır ve V_{maks} ne kadar iyi bir katalizöre sahip olduğunun bilgisini verir. Aynı reaksiyonu katalize eden ancak farklı organizmalardan türetilen enzimlerin farklı K_m değerlerine sahip olabileceğine dikkat edilmelidir. Şekil 2.8'de görüldüğü üzere fiziksel olarak K_m , V_{maks} 'ın yarısına ulaşmak için gerekli olan substrat miktarı olarak tanımlanır. K_m ne kadar düşük olursa, enzimin substrata olan afinitesi o kadar yüksektir. Düşük bir K_m değeri, enzimin doymuş hale gelmesi için yalnızca az miktarda substrata ihtiyaç duyduğunu gösterir. Bu nedenle, maksimum hıza nispeten düşük substrat konsantrasyonlarında ulaşılır. Yüksek bir K_m değeri, maksimum reaksiyon hızına ulaşmak için yüksek substrat konsantrasyonlarına ihtiyaç olduğunu gösterir. Aynı zamanda afinite veya enzimin substratına olan bağlanma isteği olarak da ifade edilebilir (Robinson, 2015; Shuler vd).



Şekil 2.9. Lineweaver–Burk grafiğinin kullanımı.

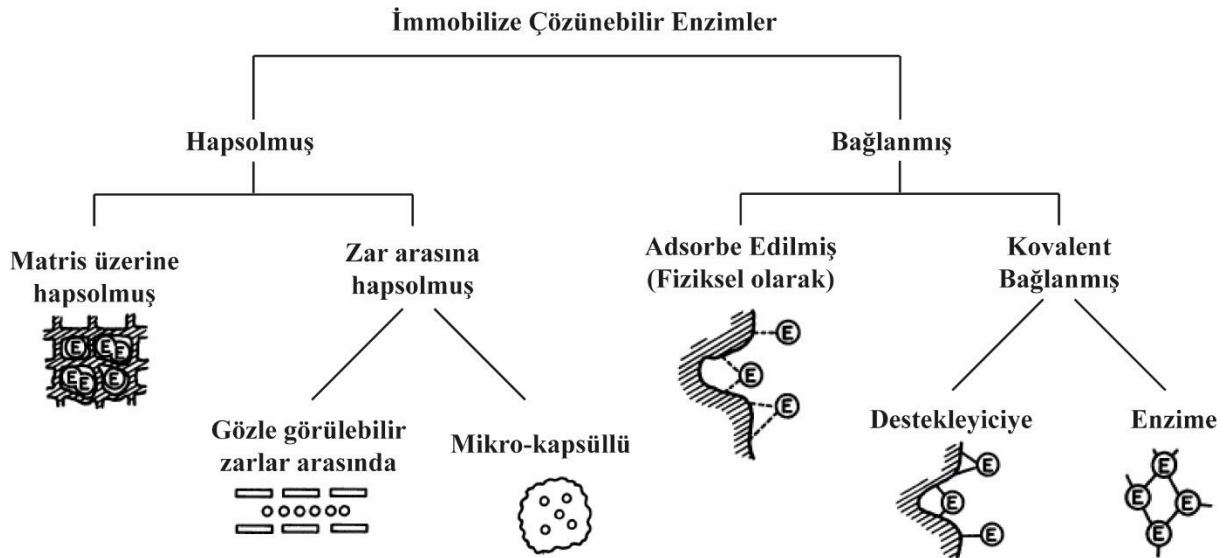
Çoğunlukla Şekil 2.8'de gösterildiği gibi elde edilen grafiklerden K_m değerlerini tahmin etmek mümkün değildir. Çünkü maksimum hızı tahmin edebilmek için oldukça yüksek konsantrasyonlar kullanmak gereklidir. Fakat bunu ihtiyaç duyulmadan yaygın olarak kullanılan alternatif yöntem Lineweaver-Burk grafiğidir. Örneğin Şekil 2.9 (A)'dan doğrudan

bir çizimle V_{max} 'ı tahmin etmek zordur. Bununla birlikte Şekil 2.9 (B)'de gösterildiği 1/substrat konsantrasyonuna karşı 1/hız grafiği çizilirse V_{max} ve K_m kolayca bulunur.

Lineweaver–Burk grafiğini kullanmanın önemli bir dezavantajı, en düşük substrat konsantrasyonlarında yapılan ölçümlere eğimi ve kesim noktasını daha çok etkiler. Bu konsantrasyonlar hataya yapmaya müsait olabilir ve yavaş olduklarından ölçüm hatasına en yatkın olabilecek reaksiyon hızlarıyla sonuçlanabilir. V_{max} için gayet hassas değerler elde etmek mümkündür fakat K_m için aynı şeyi söyleyemez. Bu tip hesaplamalarda deney sayısının mümkün olduğunca fazla olması doğrunun daha gerçekçi fit olmasını sağlayabilir. Regresyon analizini dikkatlice yapmak gerekir. Eğer doğru iyi fit olursa hassas sonuçlar almak mümkündür (Robinson, 2015; Shuler vd).

2.3.2. Enzim İmmobilizasyonu

Belirli bir alanda enzim hareketliliğinin kısıtlanmasına enzim immobilizasyonu denir. Elektrotlarda enzim immobilizasyonu hem biyosensörlerin hem de enzimatik yakıt hücrelerin verimli çalışabilmesi için önemli bir roledir. Biyosensörler için elektrotlarda geliştirilen enzimlerin immobilizasyonu, enzimatik yakıt hücrelerinin performansını ve stabilitesini geliştirmek için kullanıldı (Rasmussen vd, 2016). Enzim temelli biyosensörde, belirli bir enzim destekleyici matris üzerine sabitlenir ve dönüştürücü üzerinde tanıma elemanı olarak işlev göreceği bir kaplama oluşturur. Enzimler substratları için seçici olduklarından, enzim temelli biyo-algılamayı çok verimli hale getirir. (U. Gupta vd, 2022).



Şekil 2.10. İki ana kategoriye ayrılan enzim immobilizasyon yöntemi.

Genelde enzimler pahalı olduğundan katalizörün yeniden kullanımı önemlidir. Enzimlerin immobilizasyonu, enzimin yeniden kullanılması gibi önemli avantajlar sağlar. Enzim temelli biyosensörlerin üretimi için önemli olan başlıca enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.10 (Shuler vd, 2002)'da; özellikleri ise Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Biyosensörler için enzim immobilizasyon yöntemleri (Gavrilaş vd, 2022; Upasana Gupta vd, 2022; Hoang Hiep vd, 2017; Robinson, 2015; Shuler vd, 2002)

Enzimlerin Immobilizasyonu	Yöntemin Özellikleri
Adsorpsiyon	Basit, ucuz, enzimatik aktiviteye daha az zarar verir, ek reaktif gerekmez. Dezavantajı ise zayıf fiziksel bağlanmadan dolayı şartlardaki değişiklikler enzimin yüzeyden uzaklaşmasına neden olabilir.
Kovalent bağlar	Stabilite geliştirilebilir ve denatürasyon daha azdır; adsorpsiyon durumuna göre daha güçlü bağlar vardır.
Hapsetme	Kovalent bağın aksine kimyasal etkileşim yoktur. Yüksek stabilite ve sızıntıyı engeller.
Çapraz bağlama	Güçlü ve kararlı bağlarla enzimlerin geliştirilmiş etkinliği ve kararlılığı sağlanır.

Enzim immobilizasyon yöntemlerinden en kolayı olan adsorpsiyon, Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağlara dayanmaktadır. Enzim çözelti içerisinde çözülür ve uygulanan yüzey enzim aktivitesini sürdüren uygun koşullar altında sabit bir süre boyunca yüzeyde tutulur. Adsorplanmamış enzim molekülleri daha sonra tamponla yıkanarak yüzeyden uzaklaştırılır. Adsorpsiyonun avantajı, reaktif içermeyen, düşük maliyetli ve genellikle diğer yöntemlere göre enzim aktivitesine daha az zarar veren basit ve ekonomik bir yöntem olmasıdır. Kovalent bağ ile enzim immobilizasyonu, en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir ve enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar ile destek matrisi arasında kararlı kompleksler oluşturur. Kovalent immobilizasyon, enzimler ve destek matrisi arasında güçlü bağlar sağlar ve bu nedenle destekten az miktarda enzim sızıntısı meydana gelebilir. Kovalent olarak immobilize edilmiş enzimler, adsorpsiyona göre daha uzun inkübasyon süresi gerektirir ve enzimin bağlanması daha uzun sürer. Güçlü bağlara sahip

olduğu için, bu yöntem daha stabildir fakat tekrarlanabilirliği azaltır. Üçüncü yöntem olan hapsedme, enzim yüzeye doğrudan bağlanmaz, ancak substratların ve ürünlerin serbestçe dağıldığı dolayısıyla enzim difüzyonu kısıtlanan polimerlerde tutulur. Bu yöntemin en büyük avantajı, enzim stabilitesini geliştirebilir ve enzim denatürasyonunu en aza indirebilir olmasıdır. Bununla birlikte yöntemin sınırlaması ise meydana gelen kütle transfer direncidir ve bu nedenle substrat, enzim aktif bölgesine ulaşmaz. Hapsedme, kovalent bağın aksine kimyasal bir etkileşim değildir, enzimlere yüksek stabilite sağlar ve sızma en aza indirilir. Son olarak çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu, enzimler arasındaki moleküller kovalent bağ yoluyla üç boyutlu bir enzim kompleksi oluşturan geri dönüşümsüz bir yöntemdir. Bu yaklaşımda, enzimler arasındaki güçlü ve kararlı kimyasal bağ nedeniyle enzim sızıntısı minimumdur ve bu durum kararlılığı artırır (Upasana Gupta vd, 2022; Hoang Hiep vd, 2017; Robinson, 2015; Shuler vd, 2002).

2.4. Enzim Temelli Elektrokimyasal Biyosensörler

Mevcut enzimatik biyosensörlerin çoğu ya elektrokimyasal (amperometrik ve potansiyometrik) ya da optik dönüştürücülere dayanırken (D'Orazio, 2003), diğer tip dönüştürücüler (termal, piezoelektrik vb.) daha az sıklıkla kullanılır. Genellikle, elektrokimyasal biyosensörler herhangi bir biyokimyasal materyali ölçmek için elektrik sinyallerine dönüştürerek tespit etmektedir. Elektrotlar, biyoyumlu membran malzemeleri, biyolojik element immobilizasyonundan birleştirilen malzemeler, destekleyici substratlar ve biyolojik elementler, elektrokimyasal biyosensör üretimi için gereklidir (Ardakani vd, 2022).

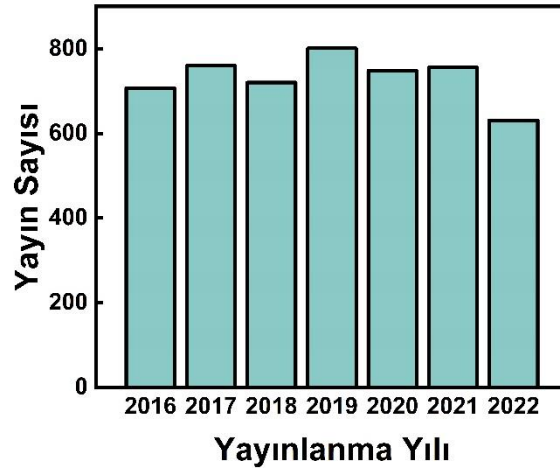
Glikoz takibi, diyabetik hastalarda glisemik kontrol için zorunlu bir sağlık değerlendirmesi olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Diyabet, kronik olarak yüksek kan şekeri seviyesinin neden olduğu önemli bir hastalıktır ve yaklaşık 415 milyon kişinin diyabetle yaşadığı tahmin edilmektedir (Tinikul vd, 2022). Diyabet hastalarının kendi kan şekeri ölçümlerini yapmalarını sağlamak için teknolojik olarak daha gelişmiş olan elde tutulan küçük biyosensörler geliştirilmiştir. Elektrokimyasal glikoz biyosensörleri, kişisel (ev) glikoz testinin taleplerini iyi bir şekilde karşıladıkları için basit, tek adımlı kan şekeri testine geçişte önemli bir rol oynamıştır. Bu türdeki ilk cihaz 1986 yılında Medisense tarafından piyasaya sürülmüştür ve İngiltere'de Cranfield ve Oxford Üniversitelerinde geliştirilen teknolojiye dayanmaktaydı. ExacTech kan şekeri ölçüm cihazı, bir kalem boyutundaydı ve tek kullanımlık elektrot şeritleri kullanılmıştı (Kyvik vd, 1990). Bu cihazı 1989'da kredi kartı tarzı bir ölçüm cihazı izlemiştir (Robinson, 2015). 1990'larda yapılan test şeritlerinde karbon işleyen bir elektrot ve bir Ag/AgCl referans elektrot sistemi kullanılmıştır. Bu şeritler için yüksek çalışma potansiyeli (400 mV),

büyük miktarda kan (20 µL) ve uzun bir test süresi (yaklaşık 20-25 s) gerekiyordu. 1999 sonlarında yapılan test şeritleri için çalışma potansiyeli 300 mV'a düşürülerek kan örneği otomatik olarak bir kılcal mekanizma ile şeritlerin kenarındaki reaksiyon alanına aktarılmış, örnek hacmi 3 µL'ye düşürülerek test yapılmıştır (C. Chen vd, 2013).

Kişisel kan şekeri monitörlerinin çoğu, tek kullanımlık perde baskılı enzim elektrot test şeritlerini kullanır. Bu tür elektrot şeritleri ticari olarak serigrafik mikro fabrikasyon veya buhar biriktirme işlemiyle üretilir. Her şerit çalışma ve referans elektrotları içerir ve çalışma elektrotu enzim, aracı, stabilizatör, yüzey aktif madde ve bağlayıcı maddelerle modifiye edilir. Bu reaktifler genellikle mürekkep püskürtmeli baskı teknolojisi ile dağıtılır ve kuru formda biriktirilir. Test şeritlerinin geliştirilmesinde cihazın minyatürleştirilmesi ve hızlandırılması amaçlanmaktadır. Geleneksel laboratuvarlarda, biyosensörler için elektrokimyasal hücreler genellikle karşılık gelen elektrolit çözeltisine yerleştirilen üç ayrı elektrotla test edilir (C. Chen vd, 2013).

2.4.1. Literatür Taraması

Şekil 2.11, son 7 yılda yayınlanan makalelerin Web of Science veri tabanı kullanılarak “Glikoz biyosensör” anahtar kelimesiyle bulunan yayın sayılarını göstermektedir. Glikoz biyosensörleriyle ilgili 2022 yılına kadar ortalama 748 makale yayınlanmıştır ve bu sayı konuya dair olan ilgiyi açıkça göstermektedir.



Şekil 2.11. 2016-2022 yılları arasında yayınlanan glikoz biyosensör yayınları.

(Erişim tarihi: 01.12.2022)

Yayınlanan 5123 makalenin 252'si derleme makalesi olarak bulunmuştur. Yalnızca “Karbon elektrot” anahtar kelimesiyle arama daraltıldığında 1516'sı (%30), “Ferrosen” anahtar kelimesiyle arama daraltıldığında 80'i (%1,5) ve “kitosan” anahtar kelimesiyle arama

daraltıldığında 288 (%6) makale bulunmaktadır. Bu anahtar kelimeler ile taratıldığında 5123 makaleden yalnızca 5 (%0,09) makale bulunmuştur. Analizler, geliştirilen enzim temelli glikoz biyosensörün elektrot malzemesinin özgün olduğunu ve ayrıca tek bir sensör tasarımında kullanılmadığını göstermektedir.

“Glikoz biyosensör” ve ‘ Enzimatik biyoyakıt hücresi’ anahtar kelimeleriyle arama yapıldığında ise 5123 makalenin sadece 135’i (%2,63) bu iki anahtar kelimeyi içermektedir. Yayınlanan 135 çalışmanın 52’si (%38,51) ise ağırlıklı olarak harici bir güç kaynağına ihtiyaç duyulmadan enzimatik biyoyakıt hücreleri kullanarak kendi kendine çalışan sensörler üzerinedir (Chansaenpak vd, 2021; Escalona-Villalpando vd, 2021; Grattieri ve Minteer, 2018; Reid ve Mahbub, 2020).

Biyosensörler, biyolojik olaylardaki tepkileri elektrik sinyallerine çevirerek numunelerin içeriğini belirler ve numunelerin analizini sağlamaktadır. Biyosensör geliştirilmenin en önemli parametrelerinden biri bahsedildiği üzere yüzey modifikasyon malzemesinin seçimidir. Analitlerin elektrokimyasal tespiti için gümüş, altın ve platin gibi soy metal temelli çeşitli nanomalzemeler kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda temel amaç analitin elektrokimyasal olarak algılanması için yeni tip metal içermeyen elektrot malzemesi hazırlamaktır. Tablo 2.4’te enzim ve organik malzeme kullanılan biyosensörler gösterilmiştir. Karbon nanotüpler, grafen ve karbon karası gibi malzemeler kullanılarak elektrokimyasal algılama için elektrot malzemeleri geliştirilmiştir. Bu karbon nanomalzemelerin çoğu pahalıdır ve karmaşık sentez süreçleri içermektedir (Asaduzzaman vd, 2023; Fatoni vd, 2013; Portaccio vd, 2013). Bu nedenle, biyokütleden elde edilen sürdürülebilir karbon, uygun maliyetli, kullanımı pratik, yenilenme süreci oldukça hızlı, kolay erişim imkânı ve çevre dostu olması nedeniyle karbon nano materyallerin sentezinde kullanılmıştır. Örneğin; soğan kabukları (Akshaya vd, 2019), tavuk tüyü (Ganesan vd, 2022), greyfurt kabuğu (Sha vd, 2018), deniz yosunu (Bilge vd, 2020) ve koza ipeği (T. T. Li vd, 2015) biyokütlelerinin HTC ve pirolizle sentezlenebilir. Bu çalışmalar biyokütleden üretilen karbon nanomalzemelerin umut verici olduğunu göstermektedir.

Tablo 2.4. Enzim ve organik malzeme temelli biyosensörlere örnekler.

Biyokütle	Karbonizasyon yöntemi ^a	Karbon/Elektrot malzemesi ^b	Analit ^c	Elektrokimyasal Performans			Kaynak
				Doğrusal Aralık	Algılama Yöntemi ^d	Gerçek Numune	
Soğan kabukları	800 °C'de tüp fırında	CNS	Progesteron hormonu	0,037-0,25 nM	CV, EIS	İnsan kan serumu, inek sütü	(Akshaya vd, 2019)
Deniz yosunu (Cystoseira)	HTC	Karbon	Vardenafil (İlaç)	0,0001-10 µM	DPV	İnsan kan serumu, idrar	(Bilge vd, 2020)
Koza ipeği	Farklı sıcaklıklarda tüp fırında	CNS	Glikoz	79,7-2038,9 µM	CV	-	(T. T. Li vd, 2015)
Altın çilek (Physalis peruviana)	700 °C'de tüp fırında	CNP	H ₂ O ₂	30 – 285 µM	DPV	-	(X. Li vd, 2018)
Tavuk tüyü (Beyaz Leghorn)	HTC, Piroлиз	KSC	HQ ve CC	0,5-176,5 µM	DPV	Nehir ve göl suyu	(Ganesan vd, 2022)

Tablo 2.4. Enzim ve organik malzeme temelli biyosensörlere örnekler 'in devamı

Çin greyfurtu kabuğu	HTC	CNANA	H ₂ O ₂	5-1760 µM	CV	İnsan kan serumu, idrar	(Sha vd, 2018)
Hindistan cevizi kabuğu	Aktif karbon	CPE	Glikoz	2-10 mM	CV	6 adet kan plazma örneği	(Fatoni vd, 2022)
Bambu	Piroliz	RC	Karbabil pestisit	5-30 nM	CA, SWV	Elma	(Nunes vd, 2022; Silva vd, 2021)
-	-	Karbon karası	BPA	0,5-50 µM	CV	Domates suyu	(Portaccio vd, 2013)
-	-	MWCNT	Glikoz	0,010-10 mM	CA	Kan plazma örneği	(Fatoni vd, 2013)
-	-	H-NPC	Laktat, glikoz, sıcaklık, pH	0-15 mM	CA	Ter	(Asaduzzaman vd, 2023)

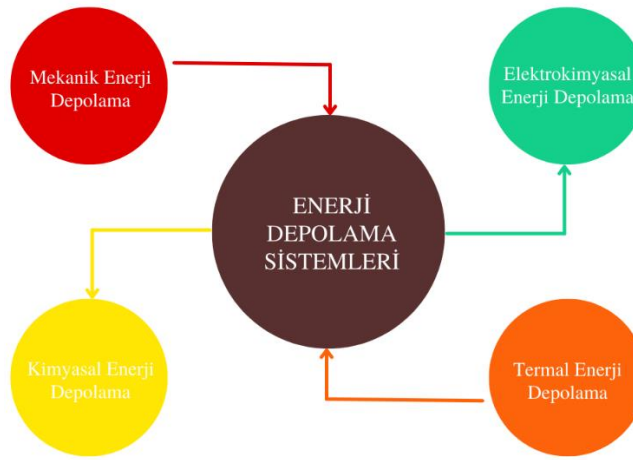
^a HTC: Hidrotermal karbonizasyon,

^b CNS: Karbon nanoküre, CNP: Karbon nanoplaka, CNANA: Karbon nanotop aerojelleri CPE: Karbon pasta elektrot, MWCNT: Çok duvarlı karbon nanotüp, KSC: Keratinli çamur karbonu, RC: Yenilenebilir karbon (biyokömür), H-NPC: Hibritleştirilmiş Nanogözenekli Karbon, ^c BPA: Bisfenol A, HQ: Hidrokinon

^d DPV: Diferansiyel puls voltametri, CV: Dönüşümlü voltametri, CA: Kronoamperometri, EIS: Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi, SWV: Kare dalga voltametri

2.5. Enzimatik Yakıt Hücresi

Elektrik enerjisi depolama sistemleri enerji üretim endüstrisi için çok önemlidir çünkü performansları, sistemin verimliliğini ve işletme maliyetini belirler. Enerji depolama kavramı mühendislik teriminde, enerjinin gerektiğinde enerji üretmek için yeniden kullanılacağı biçimde depolanması kavramına odaklanır. Çeşitli depolama sistemlerinin sınıflandırması Şekil 2.12’de ayrıntılı görülmektedir. Depolanan enerjinin şekli, uygulamaya uygun depolama cihazının türünü belirler. Enerji depolama sistemleri, yoğun ve yoğun olmayan zamanlarda öngörülemeyen olayları sürdürmek için tasarlanmıştır (Olabi vd, 2021).



Şekil 2.12. Çeşitli enerji depolama sistemleri.

Yakıt hücreleri, enerji dönüştürme ve depolama için kullanılabilen verimli enerji dönüştürme cihazlarıdır. Yakıt hücreleri genellikle, oksidasyonun meydana geldiği bir anottan, indirgemenin meydana geldiği bir katottan ve iyonların elektrotlar arasında akımı taşıdığı bir elektrolitten oluşur (Winter ve Brodd, 2004). Yakıt hücreleri çevre dostudur ve hareketli parçaların bulunmaması nedeniyle genellikle elektrik üretimi sessizdir. Güç üretimi için yakıt hücrelerinin kullanılmasının sağladığı faydalar şu şekilde özetlenebilir (Abdelkareem vd, 2021; Stambouli, 2011):

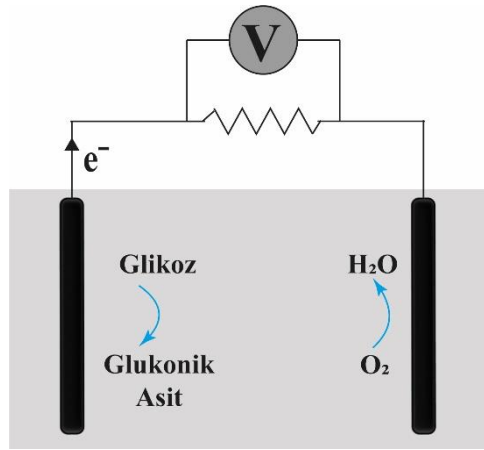
- ✓ Enerji güvenliği: Yakıt hücreleri, genellikle yerel olarak mevcut ve bol yakıtları kullanarak çalışır, dolayısıyla petrol ithalatını ve tüketimini azaltır.
- ✓ Düşük işletme maliyeti ve yüksek verim: Sermaye maliyeti fazla olmasına rağmen, bu durum düşük işletme maliyeti ile telafi edilir. Mevcut yakıtın %50-70’ini elektriğe dönüştürür.

- ✓ Sabit güç üretimi: Dizel motorları, yedek jeneratörler veya kesintisiz güç kaynağından farklı olarak sürekli güç üretir ve mükemmel raf ömrüne sahiptir.
- ✓ Yakıt seçeneği: Genellikle ithal edilen fosil yakıtların aksine, mevcut olmasına ve yerel maliyetine bağlı olarak birçok yakıt türüyle (organik/inorganik, gaz/sıvı vb.) çalıştırılabilir.
- ✓ Çevre dostu: Çevre dostu bir teknolojidir ve kullanımı özellikle sera gazı emisyonlarını azaltır veya ortadan kaldırır.
- ✓ Sessiz operasyon: İç mekâna kurulacak kadar sessizdir. İçten yanmalı motorlarda olduğu gibi ses yalıtımına veya işitme korumasına ihtiyaç duyulmaz.

Biyoyakıt hücresi, GOx temelli amperometrik glikoz biyosensörlerinin uygulamasının başka bir örneğidir. Biyoyakıt hücrelerinin en önemli özelliği biyolojik ortamda çalışmalarını ve biyolojik malzemelerden enerji elde etmeleridir. Örneğin vücutta sürekli olarak üretilen metabolizma ve solunum süreçleri tarafından alınan glikoz ve oksijen gibi enerji açısından zengin bileşiklerden sınırsız elektrik üretme yeteneği, biyoyakıt hücrelerinin önemini göstermektedir. Bu sebeple geliştirdiğimiz biyolojik yakıt hücrelerini glikoz temelli seçtik. Biyoyakıt hücreleri, kullanılan biyokatalizör tipine göre iki kategoriye ayrılır. Mikrobiyal ve enzimatik biyoyakıt hücreleri, sırasıyla canlı hücreleri ve enzimleri kullanarak yakıtın oksidasyonunu katalize eder (Gamella vd, 2018). Mikrobiyal yakıt hücreleri (MFC), çeşitli organik bileşenlerden elektrik enerjisi elde etmek için mikroorganizmaların katabolik metabolizmasını kullanır. Bir MFC, bir katot, bir anot, mikroorganizma ve çoğu durumda genellikle organik madde olan oksitleyici tabakadan oluşur (Franks ve Nevin, 2010). MFC'nin en büyük avantajlarından biri, basit şekerleri tamamen karbondioksit oksitleyebilmeleridir. Atık su arıtmada ve uzun süre enerji üretmek için oldukça uygundur. Düşük güç yoğunluğu, hücre zarlarının yavaş taşınması nedeniyle MFC'leri sınırlar. Öte yandan, enzimatik yakıt hücreleri (EBFC), MFC'lere göre hacim başına daha yüksek enerji yoğunluğuna sahiptir ve bu da onları, küçük operasyonlarda değerli bir araç olabilecekleri giyilebilir ve implante edilebilir uygulamalar için umut verici hale getirir (Serag vd, 2022).

Sonuç olarak, daha düşük çevresel etkiye sahip verimli yenilenebilir enerji üretilir. EBFC'ler, genellikle orta pH (5–8) ve sıcaklık (25–37 °C) gibi canlı organizmalar için uygun koşullarda işlev görebilir. Fakat enzimlerin ideal olmayan şartlarda hızla bozulması ve ortam değiştiğinde enzim aktivitesinin uzun sürmemesi EBFC'lerin en büyük dezavantajlarından biridir. Diğer bir konu da enzimin düşük iletkenliği ve sınırlı ömrü tarafından engellenen, enzim

ve elektrotlar arasındaki elektron transferinin etkinliğidir. Enzimin aktif bölgeleri, elektriksel teması önleyen bir protein matrisi tarafından korunur. Şekil 2.13'te görüldüğü gibi, enzimatik yakıt hücrelerinde kimyasal enerjiyi glikoz, etanol gibi yakıtların anotta elektrokimyasal oksidasyonu ve katotta oksijen indirgeme reaksiyonu gerçekleşerek doğrudan elektrik enerjisi üretmeyi amaçlar. Oksidasyon-indirgenme reaksiyonlarını (redoks reaksiyonları) katalize eden enzimlere genellikle redoks enzimleri denir. Bu enzimler iki bileşenden oluşur: apoenzim (protein bileşeni) ve kofaktör (protein olmayan). Kofaktör, enzim ve substratı arasındaki elektron transferinden sorumludur.



Şekil 2.13. Yakıt hücresinin basit şematik gösterimi.

Enzimatik biyoyakıt hücrelerinde elektron transferi iki farklı yönde gerçekleşebilir. Birincisi, üretilen elektronların enzimlerden elektrotlara aktarılması; ikincisi ise elektrotlardan enzime elektronların aktarılması (indirgeyici reaksiyon). Bu elektronlar, bir aracı veya doğrudan enzim-elektrot iletişimini içeren farklı mekanizmalar yoluyla aktarılabilir (Şahin, 2017). Enzimler ve elektrotlar arasında verimli elektron transferi elde etmek zordur ve EBFC'lerde geliştirilmesi gereken en önemli konulardan biridir. Elektron transferi için iki ana mekanizma, doğrudan elektron transferi (DET) ve aracı elektron transferidir (MET). DET, enzimin aktif bölgesinin elektrot yüzeyine yakın olduğu ve redoks reaksiyonlarının doğrudan elektrot malzemesi ile enzim arasında aktarılabilirdiği ilk elektron transfer şeklidir. Enzim ve elektrot arasındaki bu adım, protein içindeki aktif bölgenin konumu tarafından belirlenir. Aksi takdirde, yakıt hücresinin kararlılığını ve güç üretimini etkileyen açık devre potansiyelini düşürdükleri için DET'de redoks araçları kullanılmaz. Sonuç olarak, MET olarak bilinen bir süreç, enzim ve elektrot arasındaki elektron alışverişine yardımcı olabilir. Küçük boyutları göz önüne alındığında, bu araçlar mükemmel elektron transfer kinetiklerine sahiptir. Araçlar, enzim ve elektro aktif yüzey arasındaki başarılı elektron etkileşimini sağlamak için enzimin

aktif merkezinin redoks potansiyeline mümkün olduğunca yakın bir redoks potansiyeline sahip olmalıdır (Ivnitski vd, 2006; Serag vd, 2022; A. Zebda vd, 2018).

Enzim aktif bölgelerine kolayca ulaşabilen ve aktif bölge ile elektrot arasında verimli elektriksel yol sağlayan nanomalzemeler geliştirilmiştir. Çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler) dâhil olmak üzere karbon nanomalzemeler, platin veya altın ve redoks polimerleri bunlar arasındadır. Karbonun geniş kullanılabilirliği, iletkenliği, yapısal ve fizikokimyasal özelliklerin ayarlanabilirliği sayesinde, karbon temelli malzemeler büyük umut vadetmektedir. Değerli olmayan geçiş metali temelli muadilleriyle karşılaştırıldığında, karbon temelli katalizörler düşük maliyetli, daha az ağır metal kirliliği ve çevre dostu olma gücüne sahiptir (J. Wang vd, 2021).

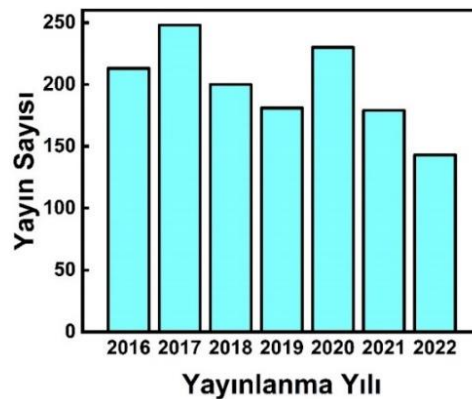
Biyokatot O_2 'nin indirgenmesini katalize eder, bu nedenle O_2 'nin sınırsız difüzyonu, biyokatot ve biyoanot arasındaki dengesiz reaksiyon hızını önlemek için kritik bir noktadır. O_2 'nin düşük çözünürlüğü olduğundan, oksijen azaltıcı elektro kataliz, O_2 'nin elektrot yüzeyine kütle transferi tarafından yönetilir; bu, biyoyakıt hücrelerinin güç çıkışını sınırlayabilir. Ancak, bir gaz difüzyon elektrotu, substrat konsantrasyonunu arttırmak için gerekli olan gaz halindeki substratları gaz fazından sağlama yeteneğine sahiptir. Çözünmüş sistemdeki bu düşük çözünürlüklü gazlı substratlar için gaz difüzyon elektrotu kütle transferi sınırlamasını da çözebilir. Gaz difüzyon elektrotları için elektrot matrisi olarak karbon siyahı ve CNT'ler gibi çeşitli hidrofobik karbon malzemeleri sıklıkla kullanılmaktadır (Huang vd, 2019).

Biyoyakıt hücresi kavramı ilk kez 1912'de kullanılmıştır, ancak 1964'te ilk enzim temelli biyoyakıt hücresi tarif edilmiştir. O zamandan beri, bu tür bir cihaz dünya çapında birçok araştırma ekibi tarafından geliştirilmeye çalışılmıştır. BFC'ler canlı organizmalara ilk olarak Mano ve Heller tarafından yerleştirmiştir (Mano vd, 2003). Cinquin ve ark. bir fareye yakıt olarak glikoz kullanan ilk BFC'yi implante etmişlerdir (Abdelkader Zebda vd, 2013). Bununla birlikte, bu implante edilebilir BFC'lerin özellikle insanlarda gerçekçi bir şekilde kullanılmasından önce, biyoyuymululuk ve sterilizasyon sorunları, zayıf operasyonel kararlılıklarıyla birlikte çözümlenmelidir. Bir biyoyakıt hücresi tarafından üretilen çıkış potansiyelini artırmanın en basit yolu, birkaç hücreyi seri olarak bağlamaktır. Örneğin biyoyakıt hücresi, 5 ayrı akış hücresinden oluşan seri bağlı devreler kurularak kalp pilinin en az 5 saat çalışması için yeterli olan elektrik gücü üretilmiştir (MacVittie vd, 2013). Potansiyel sorunu, tek bir biyoyakıt hücresi tarafından üretilen çıkış potansiyelini artıran standart bir elektronik DC-DC dönüştürücü (charge pump) kullanılarak kolayca çözülebilir. EBFC kullanılarak bir kalp piline güç sağlanmış, bu esnada üretilen potansiyel bir şarj pompası yardımıyla arttırılmış

ve kalp pili kesintisiz olarak birkaç saat boyunca çalıştırılmıştır (Southcott vd, 2013). Kullanılacak olan elektronik cihazın her zaman aktif olması zorunlu değilse ve uyku moduna alınıp belirli zaman aralıklarında kullanılıyorsa süper kapasitörler kullanılabilir. DC-DC dönüştürücü, kapasitör potansiyeli önceden belirlenmiş bir değere ulaşana kadar şarj edilebilen bir süper kapasitör ile bu etki verilebilir. Ardından kapasitör potansiyeli belirlenen bir değere düşene kadar depolanan enerji serbest bırakılır ve böylece çalışma anında yüksek güç çıkışı gösterilir. Bu sistem biyoyakıt tarafından şarj edildiği sürece döngü tekrarlanabilir. Benzer bir yaklaşımla Bandodkar ve ark. insan terindeki laktatın oksidasyonu üzerine giyilebilir (cilt üzerinde bulunan) enzim temelli biyoyakıt hücresi tarafından üretilen gücü kullanan mavi LED lambası 4 dakika boyunca yanıp sönmeye devam etmiştir. Enerjiyi biriktirerek önceden belirlenen değere ulaştığında potansiyeli serbest bırakmak için bir kapasitör kullanılmıştır (Bandodkar vd, 2017). İmplantasyon dışında analit tespiti için biyosensörde bir BFC kullanan Katz ve Willner, kendi kendine çalışan biyosensör fikrini verdiler. Kendi kendine çalışan sensörler, esas olarak, analitin akım ve güç çıkışındaki bir artış veya azalma ile tespit edildiği yakıt hücreleridir (Katz vd, 2001). Geliştirilen BFC ile Walkman cihazına hem de bağlı mobil hoparlörlere aynı anda sürekli güç sağlamaya yetecek kadar elektrik üretmişlerdir (Fujita vd, 2014).

2.5.1. Literatür Taraması

“Enzimatik biyoyakıt hücresi” anahtar kelimesiyle Web of Science veri tabanı kullanılarak son 7 yılda yayınlanan yayın sayıları Şekil 2.14’te gösterilmektedir. EBFC’lere olan ilgi, bu konunun sürekli gelişimine katkıda bulunabilecek en son makalelerin tartışılmasına ve geliştirilmesine olanak sağlar.



Şekil 2.14. 2016-2022 yılları arasında yayınlanan EBFC yayınları

(Erişim tarihi: 01.12.2022).

Şekil 2.14, EBFC'lerle ilgili 2022 yılına kadar ortalama 200 makale yayınlandığını göstermektedir. Yayınlanan 1394 makalenin 252'si derleme makalesi olarak işaretlenmiştir. 1394 makalenin, yalnızca "Glikoz oksidaz (GOx)" anahtar kelimesiyle arama daraltıldığında 379'u (%27), "Ferrosen" anahtar kelimesiyle arama daraltıldığında 21'i (%1,5) ve "kitosan" anahtar kelimesiyle arama daraltıldığında 28 (%2) makale bulunmaktadır. Bu üç anahtar kelime ile taratıldığında 1394 makaleden yalnızca 3 (%0,21) makale bulunmuştur. "Platin karası" anahtar kelimesi için hiç makale bulunamamıştır. Yakıt hücresinin anodu için bulunan 3 makalede de kullanılan elektrot malzemeleri özgün değildir. Bu analizler, tez çalışması için gerçekleştirilen yakıt hücresi tasarımının son 7 yılda hiç kullanılmadığının göstergesidir.

Tablo 1.3'te karbon temelli elektrot malzemelerin tasarlanan yakıt hücreleri üzerinde uygulanmasındaki son gelişmeler gösterilmektedir. Tasarlanan EBFC'ler başlarda herhangi bir mediyatör olmadan çalıştırılmıştır. Bu tür biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesi karmaşık prosedürler gerektirmez; sadece hücrenin yapımı için temel enzim immobilizasyon teknikleri kullanılmıştır. Amaç, doğrudan biyoelektrokataliz sergileyen ve biyolojik substratın kimyasal enerjisini hem katotta hem de anotta dönüştürebilen enzimlere dayanan temel, bölümlere ayrılmamış, aracısız biyoyakıt hücresi tasarlamaktır. Elektron transfer yöntemi olarak DET özellikli enzimlerin uygulanması redoks mediyatörüne bağlı olmamasını sağlar (Ramanavicius vd, 2008). Bununla birlikte, biyoyakıt hücresinin stabilitesi, uzun vadeli çalışma için yeterince istikrarlı olmamıştır; fakat enzimler FAD temelli olursa EBFC'nin kararlılığını ve güç üretimini etkileyen açık devre potansiyelinin yükseltilebileceği tespit edilmiştir (Serag vd, 2022). Bu doğrultuda Bölüm 2.3'te tartışıldığı gibi GOx ve MET, EBFC anotları için yaygın kullanılmıştır

Sırasıyla anot ve katotta glikoz ve oksijenin kullanıldığı anodik ve katodik reaksiyonlar için farklı enzimlere dayanan birçok farklı çalışma yayımlanmıştır. Bu çalışmaların çoğu, insan kanında doğal olarak bulunan glikozu kullanmak için fizyolojik koşullar altında implantasyon için yakıt hücrelerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Bunun için karbon temelli nanomalzemeler karbon karası, karbon nanotüp (CNT), grafit, grafen, grafen oksit gibi destekleyici elektrot malzemeleri kullanıldı; çünkü spesifik yüzey alanları, kimyasal kararlılık, yüksek mekanik dayanıklılık gibi özellikleri elektron transferi için mükemmel elektrokimyasal özellikler sağlamıştır. Glikoz/O₂ yakıtlı EBFC'lerde katodun performansı sınırlandırmaması için Pt/C katalizör ve belirli bir akışta O₂ gazıyla beslenmiştir. Tablo 1.3'te yayınlanan çalışmalarda incelendiğinde genellikle performansı arttırmak için biyoanot kısmının geliştirilmesine yoğunlaşmıştır.

Tablo 2.5. DET ve MET kullanılan enzimatik yakıt hücrelerinin yapıları ve performans parametreleri *

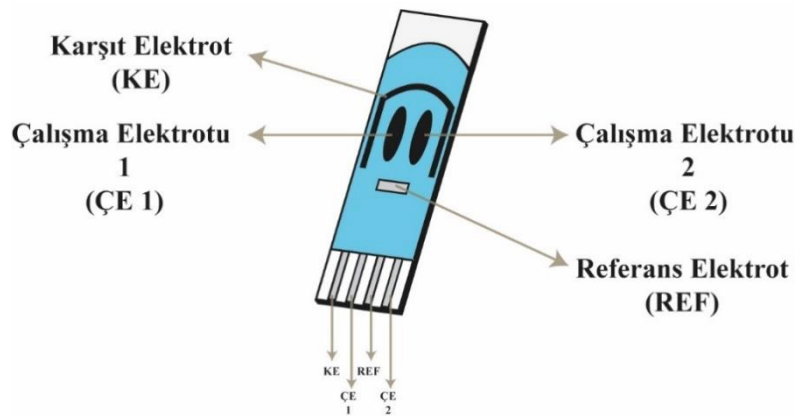
Yakıt	Anot	Katot	Elektron transfer tipi	OCP	Maksimum güç yoğunluğu	Kaynak
Etanol	QH-ADH	MP-8/AOx	DET	0,24 V	1,5 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	(Ramanavicius vd, 2008)
Glikoz/ O_2	CNT/PDA/GOx/PEI/Nafyon	CNT/BOD/Nafyon (Pt/C)	MET	0,885 V	552,8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	(Ji vd, 2022)
Glikoz/ O_2	[(TPA/HRP/GOx)] /PEI/CNT	Pt-C	MET	-	2,0 mW/cm^2	(Chung vd, 2018)
Glikoz/ O_2	GO/Co (OH) $_2$ /chit/GOx	GO/Co (OH) $_2$ /kitosan/lakkaz	MET	0,60 V	517 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	(Lee vd, 2013)
Glikoz/ O_2	Nafyon/CEC-GOx-CNT	Nafyon/Pt (Hava soluyan katot)	MET	0,33 V	120 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	(Fischback vd, 2006)
Glikoz/ O_2	Chit /GOx/CNT	GDE/Pt	MET	0,32 V	16 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	(Buckner vd, 2010)
Glikoz/ O_2	CS/PDAC-GOx/Au	Karbon katot	MET	1,09 V	1,62 mW/cm^2	(C. Chen vd, 2011)

* PDA: Polidopamin, PEI: polietilenimin, CEC: Çapraz bağlı enzim kümeleri CNT: Karbon nanotüp, GO: Grafit oksit MWCNT: PG: Kalem grafit, BOx: Bilirubin oksidaz, GDE: Gaz difüzyonlu elektrot, Chit ve CS: Kitosan, CP: Karbon kâğıt, HRP: Yaban turpu peroksidaz, TPA: Tereftalaldehit bi-enzimi.

2.6. Modifiye edilen elektrotların karakterizasyonu

2.6.1. Elektrokimyasal yöntemler

Reaksiyonlar genellikle yalnızca elektrot yüzeyine yakın olarak algılandığından, elektrotlar elektrokimyasal biyosensörlerin performansında çok önemli bir rol oynar. Belirli bir elektrotun seçilen işlevine bağlı olarak, elektrot malzemesi, yüzey modifikasyonu veya boyutları, algılama kabiliyetini büyük ölçüde etkiler (Grieshaber vd, 2008). Bir elektrokimyasal algılama sisteminde, kimyasal olarak kararlı üç veya iki elektrotlu sistemler yaygın olarak kullanılır. Düşük maliyetlerle taşınabilir aletler yapma olanağı sunmaları, bu tür elektrokimyasal sistemleri biyoalgılama için mükemmel bir seçim haline getirir. Tipik bir üç elektrotlu elektrokimyasal hücre çalışma (working), karşıt (counter) ve referans (reference) elektrottan oluşur. Çalışma elektrotu, biyoelektrokimyasal reaksiyonda dönüştürücü görevi görürken; karşıt elektrot, çalışma elektrotuna bir akım uygulanabilmesi için elektrolitik çözeltiyle bir bağlantı kurar. Bu elektrotlar hem iletken hem de kimyasal olarak kararlı olmalıdır. Bu nedenle, analite bağlı olarak platin, altın, karbon ve silikon bileşikleri yaygın olarak kullanılır. Referans elektrot, bilinen ve kararlı bir potansiyel vermek için genellikle reaksiyon bölgesinden belirli bir mesafede ve çalışma elektrotuna yakın olarak konumlandırılmıştır. Yaygın olarak gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl)'den yapılan referans elektrot, bilinen ve kararlı bir potansiyeli korumak için reaksiyon bölgesinden uzakta tutulur (Grieshaber vd, 2008; Rezaei ve Irannejad, 2019). Tez çalışmasında kullanılan karbon baskılı elektrotların (SPE) referans elektrot çeşidi ise Ag/AgCl referans elektrotu içerisindeki iyon yerine $AgNO_3$ ilave edilerek elde edilen Ag/Ag^+ 'dir.



Şekil 2.15. Karbon baskılı elektrotların (SPE) yapısı.

Karbon, düşük fiyatı ve üretim kolaylığı nedeniyle çalışma elektrot yüzeyi için tercih edilen malzemedir. Elektrokimyasal amaçlar için aletlerin tasarımı ve seri üretimi konusunda

uzmanlaşmış farklı firmalardan SPE tipi ticari olarak satın alınabilir. Şekil 2.15’de düşük üretim maliyetleri, yüksek işlem hızları ve hafif ağırlık avantajları sunan elektrot yapılarıyla kullandığımız SPE gösterilmektedir (Serrano vd, 2013). İki eliptik karbon çalışma elektrotu, bir karbon karşıt elektrot ve bir gümüş referans elektrot içerir. Serigrafi teknolojisi, elektrokimyasal amaçlar için sensörlerin ve biyosensörlerin üretimi için kabul görmüş bir yöntemdir ve erişilebilir, düşük maliyetli karakteri, çok sayıda yüksek düzeyde tekrar üretilebilir tek kullanımlık SPE'lerin üretilmesine izin verir. Bu çok yönlülük, minyatür boyutu ve onu taşınabilir enstrümantasyona bağlama olasılığı, hedef analitlerin son derece spesifik olarak yerinde belirlenmesini mümkün kılar. Elektrokimyasal immünosensörlerde, enzim temelli biyosensörlerde, DNA ve aptasensörlerde SPE'ler çok çeşitli uygulamalarda bu avantajlardan dolayı tercih edilmektedir (Rezaei ve Irannejad, 2019). Elektrokimyasal ölçümler ile malzemelerin dönüşümlü voltametri (CV), doğrusal taramalı voltametri (LSV) ve kronoamperometri (CA) analizleri yapılmaktadır.

Amperometrik yöntem

Genellikle biyosensör uygulamalarına yönelik kullanılan bu sistem, bir biyokimyasal reaksiyonda elektrotların yüzeyindeki elektroaktif türlerin indirgenmesi veya oksidasyonundan kaynaklanan akımı sürekli olarak belirleyen elektrokimyasal cihazlardır. "Amperometri" terimi, hücrede veya çalışma ve referans elektrotlar arasında potansiyel sabit tutulurken, zaman içinde akımdaki değişimlerin izlenmesi sürecini ifade eder (Rezaei ve Irannejad, 2019). Bu yöntem, sabit potansiyel uygulanarak sistemin verdiği cevabı akım cinsinden ölçer. Bu bağlamda, doğrusal bir potansiyel aralığında ölçülen tepe akım değeri, çözeltide bulunan analitin yığın konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir.

Bir amperometrik biyosensörün özellikleri; immobilize edilen enzimin aktif bölgesi ile uygun bir çalışma potansiyelinin uygulandığı bir elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer sürecinin kinetiğine bağlıdır. Yüksek duyarlılık ve hızlı cevap özelliklerine sahip bir amperometrik biyosensör geliştirmenin en basit ön koşulu; biyobileşenden elektroda hızlı bir elektron transferini mümkün kılmaktadır (Habermüller vd, 2000).

Dönüşümlü Voltametri

Referans elektrot ile çalışma elektrot arasındaki potansiyel ölçülürken, çalışma elektrot ile karşıt elektrot arasındaki akım ölçülür. Elde edilen ölçümler, voltamogram olarak da bilinen akıma karşı potansiyel grafiği olarak çizilir. Bu yöntemde, bir tepe (pik) şeklinde görünen mevcut yanıt, analit konsantrasyonuna karşılık gelir. Verimli voltametrik yöntemler arasında

doğrusal taramalı voltametri (LSV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), dönüşümlü voltametri (CV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) vardır (Zafar vd, 2022). LSV’de, sabit bir potansiyel aralığında bir alt sınırdan bir üst sınıra doğru taranır. Her eğri aynı forma sahiptir, ancak artan tarama hızıyla toplam akım artmaktadır. Akımın maksimum olduğu noktada, tepe noktası aynı potansiyelde meydana gelmektedir. Bu durum hızlı elektron transfer kinetiğine sahip elektrot reaksiyonlarının bir özelliğidir ve bu süreçlere tersinir elektron transfer reaksiyonu denir (Cambridge, 2022).

CV ise en yaygın kullanılan voltametri yöntemlerinden biridir; redoks potansiyeli ve elektrokimyasal reaksiyon hızları hakkında bilgi elde etmek için kullanışlıdır (Rezaei ve Irannejad, 2019). Bu yöntemde potansiyel, başlangıç değerine dönmeden önce belirli bir değerden (V_1) önceden belirlenmiş bir değere (V_2) taranır. Tersine çevrilebilir bir elektrokimyasal reaksiyon için kaydedilen CV'nin belirli bazı özellikleri vardır (Cambridge, 2022);

- Tepe akımlarının oranı bire eşittir. $\frac{i_p^a}{i_p^c} = 1$

- Tepe akımları, tarama hızının karekökü ile orantılıdır.

LSV'de olduğu gibi, tarama hızının etkisi, difüzyon tabakası kalınlığı cinsinden tersinir bir elektron transfer reaksiyonu için açıklanmaktadır. CV’de tarama hızı değiştirilerek reaksiyon adsorpsiyon veya difüzyon kontrollü olduğu bilgisi edinilebilir.

Kronoamperometri

Kronoamperometri (CA), köklü bir amperometrik tekniktir. Bu yöntemde, çalışan elektrota bir potansiyel uygulanır ve hücreden geçen akım zamana karşı belirlenir. Genellikle zamana bağlı sistem karakterizasyonu için CV gibi diğer tekniklere ek olarak kullanılan kronoamperometri, reaktanların etiketlenmesini gerektirmeyen hassas bir tekniktir.

2.6.2. Karakterizasyon Yöntemler

Modifiye yüzeylerin karakterizasyonunda kullanılan birçok yöntem vardır. Elde edilen nanoyapılı yüzeylerin karakterizasyonu, yüksek çözünürlüklü yüzey görüntüleme teknikleri (transmisyon elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), taramalı tünelleme mikroskobu (STM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM)) ayrıntılı bilgi verebilir. Yüzey tabakalarını araştırmak ve haritalamak için çok çeşitli yerleşik teknikler de kullanılmaktadır. Bu teknikler elipsometri, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), X-

ışını foto elektron spektroskopisi (XPS), X-ışını difraktometresi (XRD) Fourier dönüşümü-kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ve Raman spektroskopisi olarak sıralanabilir (Monteiro ve Almeida, 2019).

- FT-IR → Düşük enerjili kızıl ötesi bölgedeki ışınları kullanan adsorpsiyon spektroskopisidir. Bu yöntemle veri zaman boyutundan frekans boyutuna geçirilir ve farklı frekanslardaki absorpsiyonlar grafiğe dökülür. Interferogram denilen bu spektrum, adsorpsiyon spektrumunun Fourier dönüşümüdür. Burada ölçülen absorpsiyonlar pikler ile ifade edilir. Kimyasal bağlar (C-H, C-C gibi) aynı miktarda ve aynı şekilde enerji absorplamadıkları için elde edilen pikler, molekül içindeki fonksiyonel grupları tanımlar. Pikler yapılarına bağlı olarak kuvvetli, orta ve zayıf, şekillerine bağlı olarak geniş, orta ve dar olarak tanımlanır. IR spektrumları, piklerin bulunduğu yere, yapılarına ve şekillerine göre irdelenerek numunelerde malzeme cinsi tayin edilir (Jackson ve Mantsch, 1995).
- SEM → Taramalı elektron mikroskobu morfolojik ve topografik bilgi veren analiz yöntemlerinden biridir. SEM tekniğinde örnek, elektron demetleriyle bombardıman edilir. Elektronların dalga boylarının kısa olması nedeniyle optik mikroskoba göre daha iyi çözünürlük elde edilir. Elektronların örnek içerisinden geçebilmesi için örneğin iletken olması gerekmektedir. Analizi yapılacak örneğin yalıtkan olması durumunda yüzeye özel yöntemlerle altın püskürtülerek ince bir iletken film oluşturulur. Sonuç olarak elde edilen görüntüde tıpkı olağan fotoğraflardaki gibi gölge ve perspektif oluşur (Skoog vd, 2017).
- XRD → X ışını kırınım analiz yöntemi malzemelerin yığın faz yapısının belirlenmesinin yanında parçacık boyutu ve yığın fazdaki dönüşüm kinetiğinin belirlenmesinde kullanılır (Simsek, 2015). Ayrıca bu yöntem, maddenin veya malzemenin kristal yapısını inceleyerek mineralojik bileşimlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında malzeme sentezi için tüp fırın (Protherm Furnaces) kullanılmıştır. Sentezlenen malzemelerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyon analizleri Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi'nde bulunan ZEISS marka Supra 40 VP model SEM/EDX (taramalı elektron mikroskobu), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR, Agilent Cary 360) ve X-Işını Kırınım (XRD, Panalytical-Emprean) cihazlarıyla yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Fiziksel ve kimyasal karakterizasyon için kullanılan (A) SEM/EDX, (B) XRD ve (C) FT-IR cihazları

Malzemelerin tartılmasında hassas terazi (Radwag/AS 220.R2, Polonya) ve çözelti hazırlanmasında ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Ika-c/Mag HS 7, Almanya), ultrasonik banyo (Bandelin RK 100 H, Almanya) ve vorteks karıştırıcı (Jeto Tech/VM-96B, Kore), hazırlanan çözeltilerin pH ölçümleri için pH metre (Mettler-Toledo, İsviçre) kullanılmıştır. Sulu çözeltilerin hazırlanmasında ve yıkama işlemlerinde MP Minipure Dest Plus ve MP Minipure Basic M Up cihazından ultra saf su elde edilmiştir. -20 ve/veya -80 °C'de saklanması gereken maddeler ilgili sıcaklığa inebilen derin dondurucuda, +4 °C'de saklanması gereken maddeler buzdolabında muhafaza edilmiştir. Elektrot kaplama işlemi için ısı tabancası (Maestro JS-HG-12AII, Çin) ve mikropipetler (Eppendorf ve Brand) kullanılmıştır.

Elektrokimyasal ölçümler Dropsens firmasından alınan SPE (DRP-X1110, çalışma elektrotu alanı: 0,059 cm²) üçlü elektrot sistemi ile yapılmış olup karşıt elektrot karbon, referans elektrot olarak Ag/Ag⁺ (~-0.15 V ve Ag/Ag⁺), çalışma elektrotu ise karbon veya sentezlenmiş karbon malzeme ile potansiyometre (Ivium Technologies, B.V., Hollanda) kullanılarak yapılmıştır. Enzimatik yakıt hücresi performans analizinde rezistans kutusu (Lutron Rbox-408) ve dijital multimetre (Fluke 17B⁺) kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich veya Merck firmasının temin edilmiştir, en az analitik saflıktadır ve başka bir işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Tampon çözeltisi:

0,1 M PBS (Phosphate Buffered Saline) tampon çözeltisi: 8,70 g dibazik fosfat hassas terazi ile tartılıp huni kullanılarak ultra saf su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Ayrıca 3,40 g monobazik hassas terazi yardımıyla tartılıp ultra saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen stok çözeltiler 15 dakika sonikatörde bekletilmiştir. İstenilen pH aralığını elde etmek için stok çözeltilerden belirli miktarlar da alınarak karıştırılmıştır. Karıştırılan çözelti pH metre ile ölçülerek istenilen pH aralığında tampon çözeltisi elde edilmiştir (Şekil 3.2). Elde edilen tampon çözeltinin pH aralığı 7,39-7,44'tür. Tampon çözeltinin pH aralığı belirlenen günlerde kontrol edilerek sabit bir değerde deneylere yapılmıştır. Deneylerde kullanılan tampon çözeltisinin pH'ı 7,40'tır. Hazırlanan tampon çözeltiler 23 ± 2 °C sıcaklığında saklanmıştır.



Şekil 3.2. Hazırlanan tampon çözeltinin pH ölçümü

Enzim Çözeltisi:

Enzim çözeltisi için GOx enzimi Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. Enzim konsantrasyonunun etkisini görmek için stok enzim çözeltileri hazırlanmıştır. Stok enzim çözeltisi için sırasıyla 0,001-0,01-0,02-0,04 g katı tartılarak 0,1 M PBS tampon çözeltisiyle 1 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Elde edilen enzim çözeltilerinin konsantrasyonları 1 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL'dir. Hazırlanan stok GOx çözeltileri her biri yaklaşık 5 µL olacak şekilde tüplere bölünmüştür ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Substrat Çözeltisi

0,1 M Glikoz çözeltisi: 0,180 g glikoz tartılıp 0,1 M PBS ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Test çalışmalarında kullanılan farklı konsantrasyonlar stok çözeltinin seyreltilmesiyle elde edilmiştir. Test çalışmalarında ise 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM glikoz çözeltilerinden 200 µL alınarak kullanılmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Polimer Filminin Hazırlanışı:

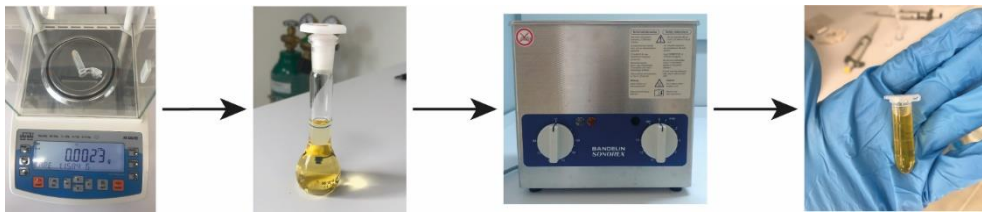
0,1 M Asetik asit içerisinde %1 g/mL kitosan (Chit) hazırlanışı: 0,1 g Chit tartılıp 0,1 M asetik asitle 10 mL'ye tamamlanmıştır. Uygun bir cam şişeye alınıp ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 50 °C'de 600 rpm devirle 3 saat sonunda çözünmüştür (Şekil 3.3). Çözücünün uçması için parafilmle kaplarda ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. Polimer filmin hazırlanma aşaması

Test Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler:

0,1 M Potasyum Klorür (KCl) hazırlanışı: Satın alınan KCl kütlesi 1,863 g hassas teraziyle tartılarak balon jodede 250 mL'ye 0,1 M PBS ile tamamlanmıştır. Balon jodede bulunan çözelti sonikatör yardımıyla karıştırılarak hazırlanmıştır. Stok çözelti +4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Test çözeltisinde kullanılan FcCOOH çözeltisinin hazırlama basamakları

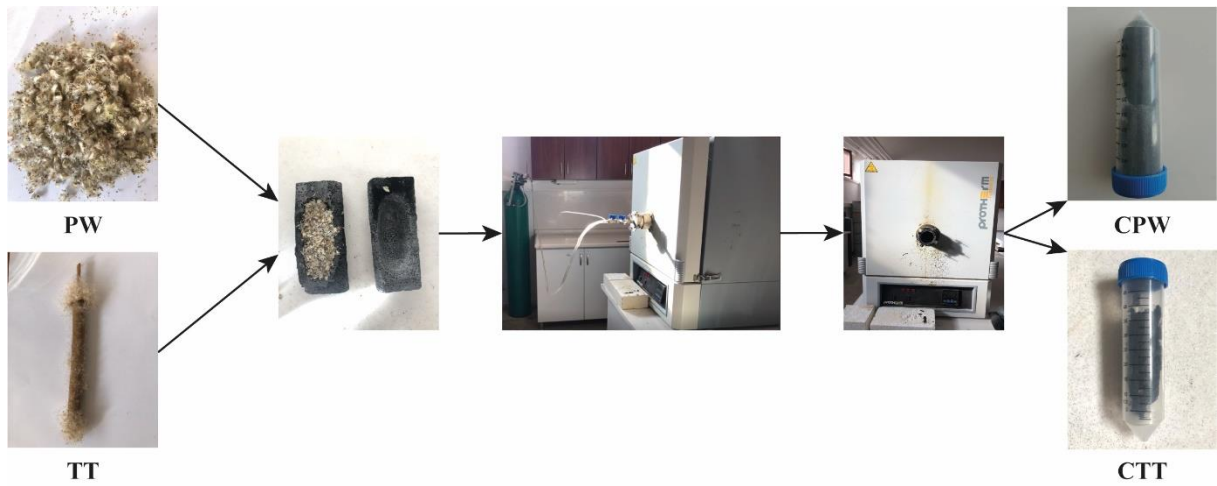
0,1 M PBS içinde 1 mM Ferrosenkarboksilik Asit (FcCOOH) hazırlanışı: Satın alınan FcCOOH kütlesinden 0,00230 g hassas terazi ile tartılarak balon jodede 10 mL'ye 0,1 M PBS ile tamamlanmıştır. Balon jodede bulunan çözelti sonikatör yardımıyla 15 dakika karıştırılarak

homojen bir çözelti elde edilmiştir. Yapılan deney çalışmalarının sonucuna bakılarak en uygun muhafaza koşulu oda sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Deney çalışmaları için kullanılacak 0,1 M PBS içerisinde 1 mM FcCOOH oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Şekil 3.4).

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyokütleden Karbonize Malzeme Sentezi ve Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında belirlenen iki farklı biyokütle kaynağından karbonizasyon yöntemiyle karbon malzeme sentezleme işlemi Kütahya Dumlupınar Üniversitesi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Sentezlenen CTT ve CPW malzemelerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri XRD, FTIR, SEM/EDX ve Mapping yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.



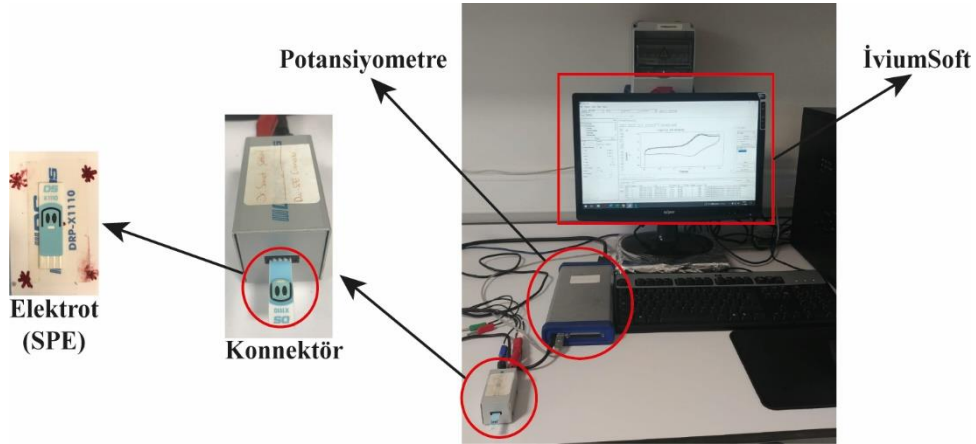
Şekil 3.5. Biyokütle kaynaklarından karbonizasyon yöntemiyle karbon malzeme sentezleme süreci.

CTT ve CPW malzemelerinin moleküler faz yapıları için kullanılan XRD analizleri, HT-XRD cihazıyla $2\theta=5^{\circ}-90^{\circ}$ aralığında gerçekleştirilmiştir. Karbonize malzemelerin içerisinde bulunan fonksiyonel grupları tanımlamak için FT-IR analizleri Perkin Elmer-Spektrum 100 marka IR cihazında; ATR (Attenuated Total Reflectance) tekniği kullanılarak $4000-300\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. CTT ve CPW malzemelerinin SEM görüntüleri, Zeiss Supra VP 40 model SEM/EDX cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Numuneler çift taraflı karbon banta yapıştırılmıştır ve Quorum-Q300 model cihazda vakum altında 1 dk boyunca Au/Pd kaplama yapılarak elektriksel iletkenlik kazandırılmıştır. Analizler 15 kV elektron yükü altında gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen malzemelerin farklı çözücülerle dispersiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir ve en iyi dispersiyonun elde edildiği şartlar belirlenmiştir.

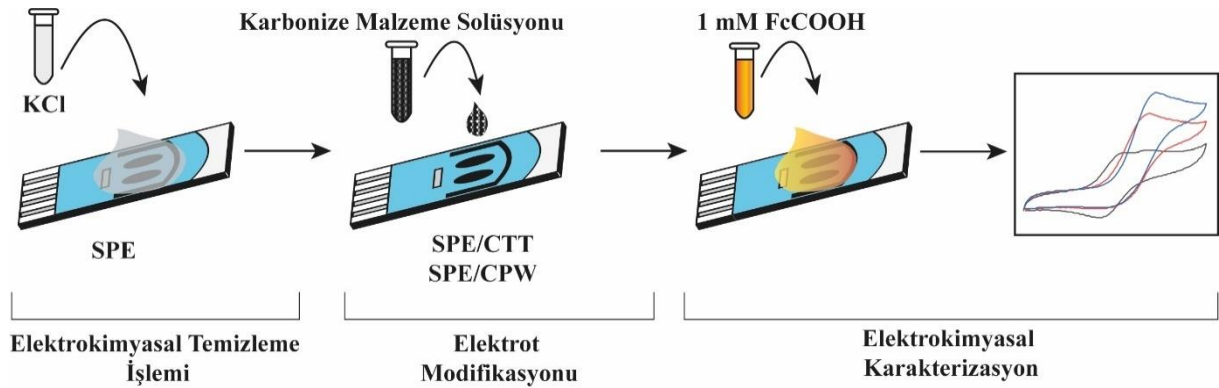
3.2.2. Karbonize Malzemelerin SPE'lere Kaplanması ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Sentezlenen karbonize malzemeleri SPE'lere kaplamadan önce kullanılacak olan her elektrot için yüzey temizlik işlemi yapılmıştır. Bu kapsamda, elektrokimyasal temizlik işlemi 0,1 M KCl içerisinde 0 – (-2) V (vs Ag/ Ag⁺) aralığında 1 mV potansiyel adımı ve 20 mV/s tarama hızında doğrusal taramalı voltametre (LSV) tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Elektrokimyasal karakterizasyon için kullanılan sistem düzeni

CTT ve CPW ile hazırlanan süspansiyonlar SPE'ler üzerine 0,50-0,75-1,00-1,25-1,50 mg/cm² toplam malzeme yoğunluğu olacak şekilde kaplanmıştır. Damla kaplama (drop coating), bir yüzey üzerinde bir tabaka biriktirmek ve bunu bir alıcı eleman ile modifiye etmek için basit ve hızlı tekniktir. Özellikle laboratuvar şartlarında, atık malzeme oluşturmayan yüzey modifikasyonu için en kolay yaklaşımdır. Küçük ve tanımlanmış bir alanın kaplanması için uygundur, çünkü daha büyük alanlar için filmin kalınlığını, gözenekliliğini ve homojenliğini kontrol etmek daha zordur (Bauer vd).



Şekil 3.7. Karbonize malzemelerin SPE'lere modifikasyonu ve elektrokimyasal karakterizasyonun şematik gösterimi

Elektrokimyasal karakterizasyon Şekil 3.6'da gösterilen sistem düzeneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karbon malzemenin etkisini görebilmek amacıyla hiçbir malzeme kaplı olmayan SPE de test edilmiştir. Kaplanan elektrotlar CTT ve CPW için sırasıyla SPE/CTT ve SPE/CPW olarak simgelenmiştir. Kaplama işlemi tamamlanan elektrotlar CV tekniği kullanılarak 1 mM FcCOOH içerisinde elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Şekil 3.7).

Farklı malzeme yoğunluklarıyla kaplanan SPE'ler CV tekniği kullanılarak -0,1- 0,4 V (vs Ag/ Ag⁺) potansiyel uygulanarak 50 mV/s tarama hızında 0,1 M PBS içeren 1 mM FcCOOH ile gerçekleştirilmiştir. Pik akımları ve SPE'lere yapılan kaplamaların yüzeye tutulma oranı analiz edilerek maksimum malzeme yoğunluğu seçilmiştir. Seçilen malzeme yoğunluğunun CV analiz sonuçları incelenerek CA için uygulanacak potansiyel belirlenmiştir. Yapılan tüm deneyler önceden yapılan gözlemlerle belirlenen standartlara uygun olarak yapılmıştır. Bu standartlara göre:

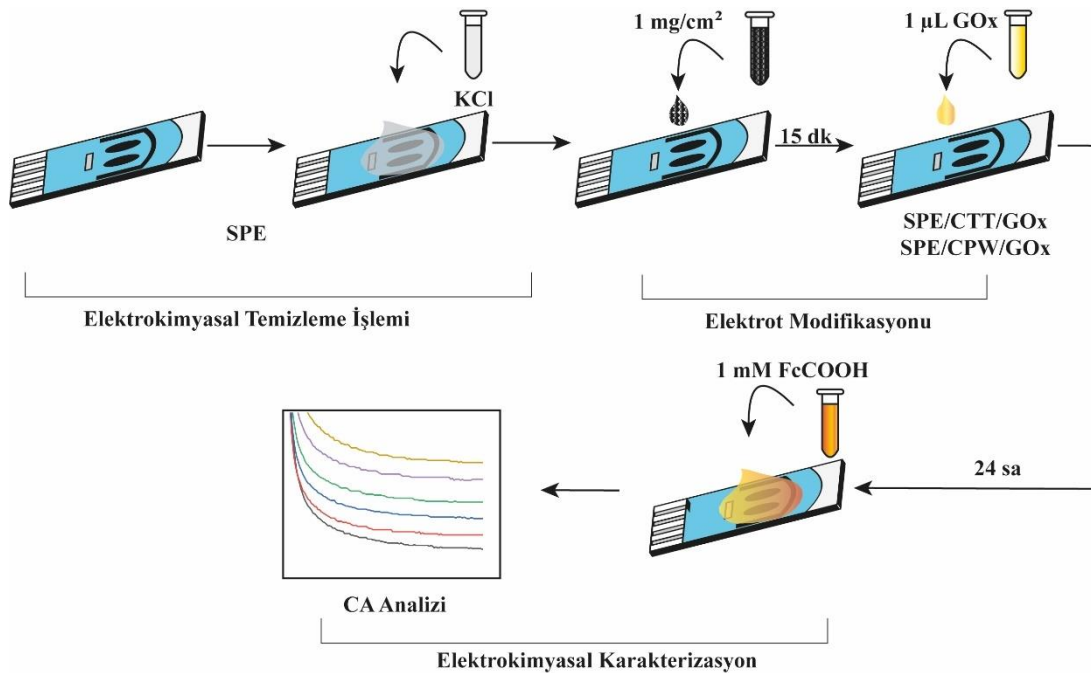
- Tüm kaplamalar ve elektrokimyasal karakterizasyonlar 23±2 °C sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
- Kalibrasyon eğrisi elde edilirken deneyler en az 4 numune (n = 4) olacak şekilde tekrar edilmiş, ortalamaları alınarak standart sapma değerleri hesaplanmıştır.
- Hazırlanan süspansiyonlar ertesi gün ve günler arası olarak gözlemlenmiştir.
- Hazırlanan süspansiyonlar yapılan her deneyden önce ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilmiştir.
- SPE uygulanan her bir kaplama işleminden sonra test aşamasına geçmeden önce 15 dakika beklenmiştir. Bu işlemin uygulanmasının sebebi kaplamadan hemen sonra test edildiğinde kaplama hemen kurumadığı için bazı sızıntılar gözlemlenmiştir. Dolayısıyla malzeme miktarında kayıp olduğu için elde edilen verilerde farklılık olmuştur.
- Malzeme kaybını engellemek için oda sıcaklığında SPE'nin üzeri kapatılarak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu şekilde yapıldığında malzeme kaybı minimum seviyeye düşürülmüştür.
- Elektrokimyasal karakterizasyon işlemi 1 mM FcCOOH içeren 0.1 M PBS içinde gerçekleştirilmiştir. En uygun standart olarak dolaptan kullanacağımız miktar kadar alıp, oda sıcaklığına geldiğinde test edilmesi olarak belirlenmiştir.

3.2.3. Enzimatik Elektrotların Hazırlanması

Bu kısımda sentezlenen karbonize malzemelerden iletken elektrot malzemesi üretilerek biyoelektronik uygulamalarda kullanılmıştır. Bir biyoelektronik uygulaması olan biyosensörler için enzim temelli elektrotlar geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör için en iyi çalışma koşullarını belirleyebilmek için 4 farklı yöntem geliştirilmiştir. Bütün yöntemlerde karbonize malzeme yoğunluğu 1 mg/cm^2 olacak şekilde SPE'lere kaplanmıştır. Ayrıca enzim tutuklanma için ilk olarak $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen GOx ($0,1 \text{ M}$ PBS içerisinde) çalışma elektrotuna uygulanmadan önce 15 dakika $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de, 15 dakika ise oda sıcaklığında bekletilmiştir. GOx enzimi çalışma elektrotların üzerine $1 \text{ } \mu\text{L}$ damlatılmış ve $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiştir. Enzim tutuklanması gerçekleştirildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika PBS'de bekletilmiştir ve üç kez yıkanarak yüzey ile zayıf bağ yapan veya bağlanmayan enzim yüzeyden uzaklaştırılarak gerekli testler yapılmıştır. Hazırlanan elektrotlar kullanıma kadar $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.1. SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx Elektrotların Modifikasyonu

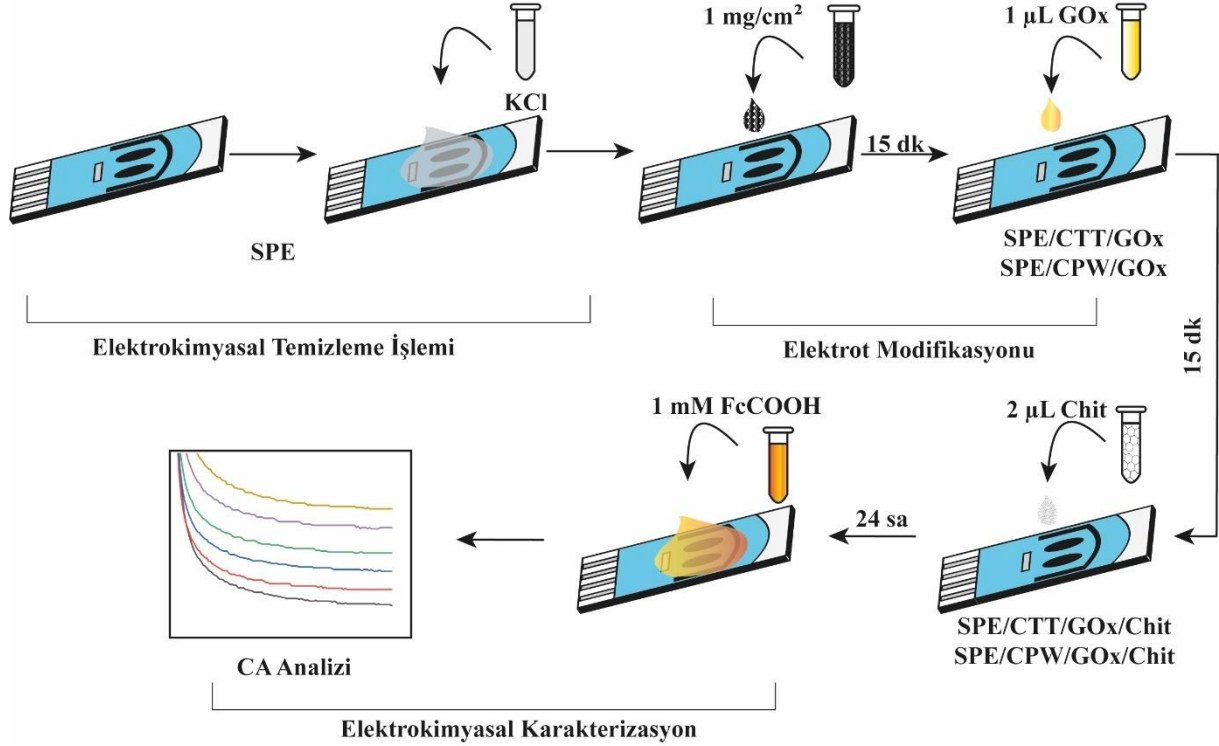
Karakterizasyon işlemi sonrası SPE/CTT ve SPE/CPW elektrotlarına enzim tutuklanması Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilerek GOx enzimi (1 mg/mL) çalışma elektrotların üzerine $1 \text{ } \mu\text{L}$ damlatılmış (SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx) ve $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiştir. Ardından zaman kaybetmeden SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx ile modifiye edilmiş elektrotların glikoz varlığında ve yokluğundaki aktivitesi elektrokimyasal olarak test edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx ile modifiye edilmiş elektrotların şematik gösterimi

3.2.3.2. SPE/CTT/GOx/Chit ve SPE/CPW/GOx/Chit Elektrotların Modifikasyonu

SPE/CTT ve SPE/CPW elektrotlarına enzim tutuklama işlemi Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.



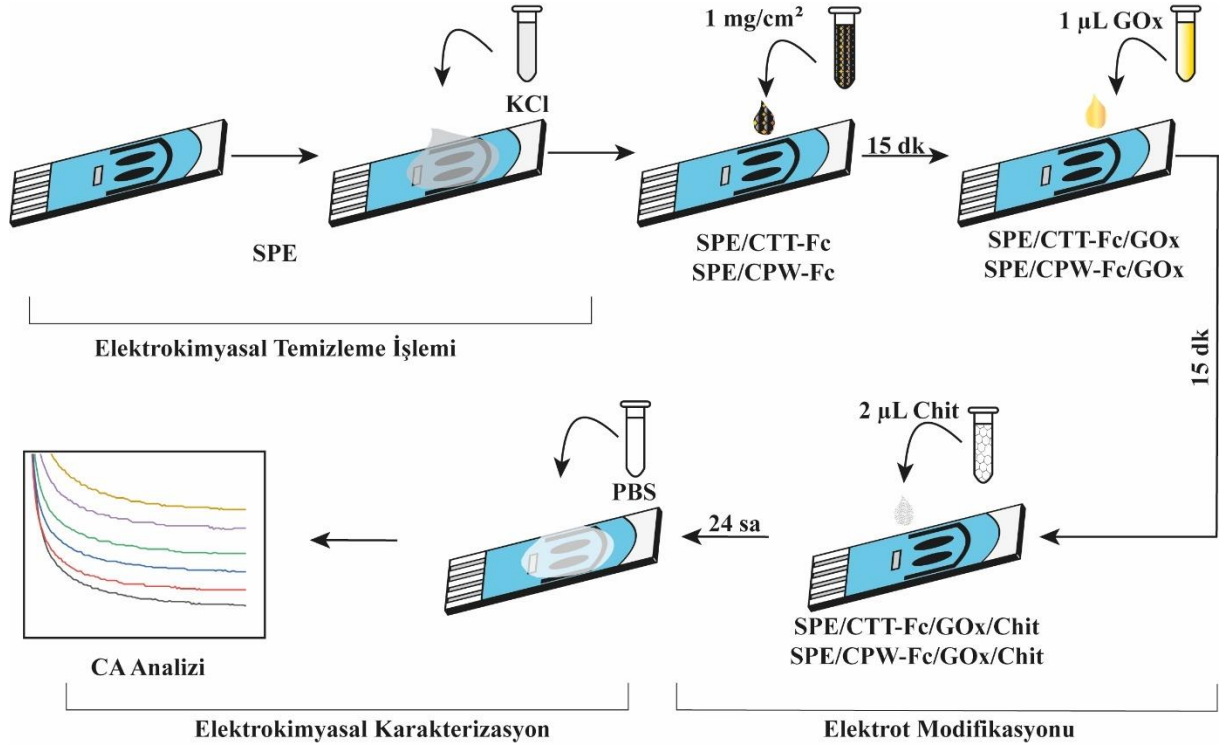
Şekil 3.9. SPE/CTT/GOx/Chit ve SPE/CPW/GOx/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların şematik gösterimi

Birinci yöntemden farklı olarak SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx elektrotların üzeri biyoyumluluğu yüksek doğal bir polimer olan kitosan (Chit) ile kaplanmıştır. Bu kapsamda, 0,1 M asetik asit içerisinde %1 g/mL Chit SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW//GOx çalışma elektrotu üzerine 2 µL damlatılarak yüzeyde ince bir film oluşturulmuştur. Hazırlanan SPE/CTT/GOx/Chit ve SPE/CPW/GOx/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların glikoz varlığında ve yokluğundaki aktivitesi elektrokimyasal olarak test edilmiştir (Şekil 3.9).

3.2.3.3. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit Elektrotların Modifikasyonu

Bu yöntemde elektron taşıyıcısının SPE'nin yüzeyinde hapsedmenin elektrokimyasal olarak performansı arttıracığı öngörülmüştür. Bu kapsamda CTT veya CPW malzemeleriyle, enzim ve elektrotlar arasında elektron taşıyıcı olarak kullanılacak ferrosen (Fc) karıştırılarak bir süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan Fc çözeltisi için farklı çözücülerle dispersiyon

işlemleri gerçekleştirilmiştir ve en iyi dispersiyonun elde edildiği şartlar belirlenmiştir. İlk olarak CTT veya CPW 50 mM Fc ile karıştırılarak bir süspansiyon hazırlanmış ve SPE'ler üzerine malzeme yoğunluğu 1 mg/cm^2 olacak şekilde kaplanmıştır. Kaplanan elektrotlar CTT ve CPW için sırasıyla SPE/CTT-Fc ve SPE/CPW-Fc olarak simgelenmiştir.



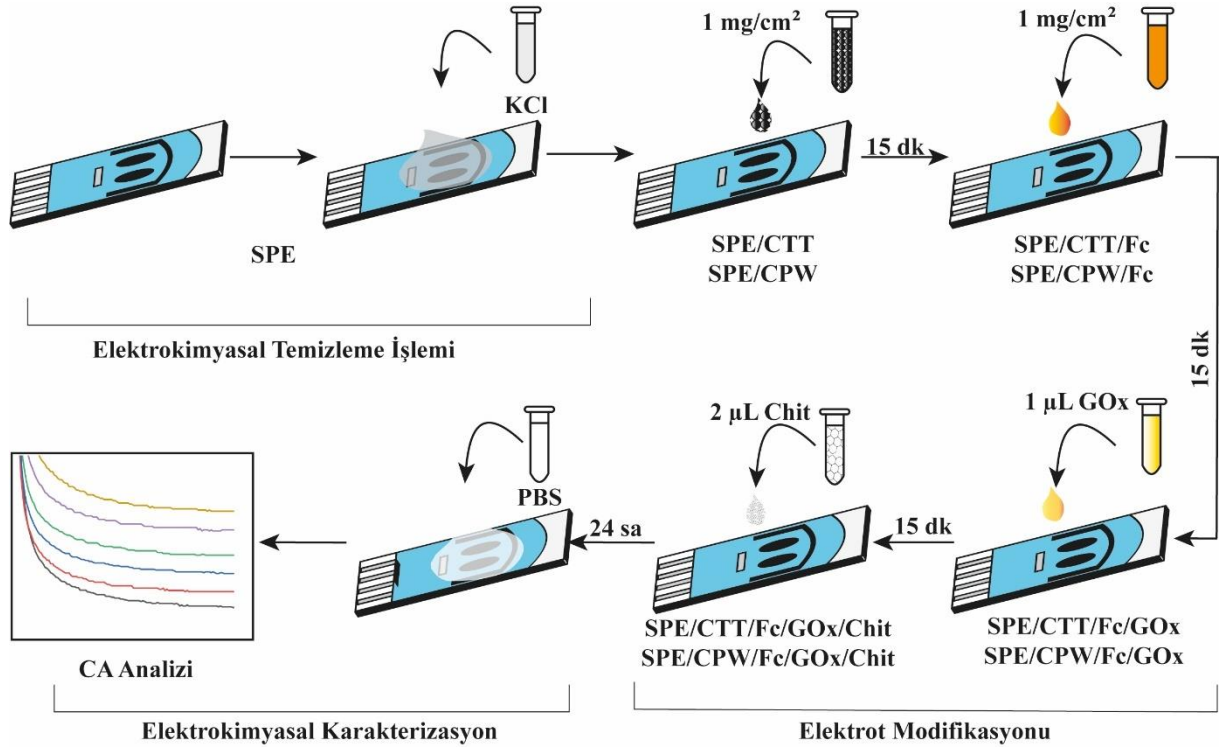
Şekil 3.10. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların şematik gösterimi

Bölüm 3.2.3'te anlatılan yöntem kullanılarak GOx enzimi (1 mg/mL) çalışma elektrotu üzerine $1 \text{ } \mu\text{L}$ hacimde damlatılmıştır. SPE/CTT-Fc/GOx ve SPE/CPW-Fc/GOx elektrotların çalışma elektrotu üzerine Chit $2 \text{ } \mu\text{L}$ damlatılarak yüzeyde ince bir film oluşturulmuştur. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların glikoz varlığında ve yokluğundaki aktivitesi elektrokimyasal olarak test edilmiştir (Şekil 3.10).

3.2.3.4. SPE/CTT/Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW/Fc/GOx/Chit Elektrotların Modifikasyonu

Bu yöntemde ise Bölüm 3.2.3.3'te anlatılan modifikasyondan farklı olarak mediyatör CTT ve CPW malzemeleri yüzeye kaplandıktan sonra modifiye edilmiştir. SPE yüzeyine her iki malzeme içinde malzeme yoğunluğu 1 mg/cm^2 olacak şekilde kaplanmıştır ve 15 dakika oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır. Ardından Fc yüzeye malzeme yoğunluğu 1 mg/cm^2 olacak şekilde kaplanmıştır ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Enzim tutuklama işlemi ise

Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilerek GOx enzimi (1 mg/mL) çalışma elektrotu üzerine 1 μ L hacimde damlatılmıştır.



Şekil 3.11. SPE/CTT/Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW/Fc/GOx/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların şematik gösterimi

Son olarak 0,1 M asetik asit içerisinde %1 g/mL Chit SPE/CTT/Fc/GOx ve SPE/CPW/Fc/GOx çalışma elektrotu üzerine 2 μ L damlatılarak yüzeyde ince bir film oluşturulmuştur. Hazırlanan SPE/CTT/Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW/Fc/GOx/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların glikoz varlığında ve yokluğundaki aktivitesi elektrokimyasal olarak test edilmiştir (Şekil 3.11).

3.2.3.5. Modifiye Edilmiş Elektrotların Glikoz Duyarlılığının Test Edilmesi

Dört farklı yöntemle hazırlanan biyosensörlerin glikoz varlığında ve yokluğundaki aktivitesini test etmek için CV ve CA yöntemleri kullanılmıştır. CV analizi için -0,1- 0,4 V (vs Ag/Ag⁺) potansiyel, 20 mV/s tarama hızında, CA analizi için ise 120 saniye boyunca 0,3 V (vs Ag/Ag⁺) uygulanmıştır. Bölüm 3.2.3.1 ve 3.2.3.2'de anlatıldığı gibi modifiye edilen elektrotların testleri 0,1 M PBS ile hazırlanan 1 mM FcCOOH çözeltisinin içerisine eklenen farklı glikoz konsantrasyonlarıyla gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.3.3 ve 3.2.3.4'de anlatıldığı gibi modifiye edilmiş elektrotların testleri ise 0,1 M PBS içerisinde farklı glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Test çalışmalarında ise 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM,

10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM glikoz çözeltilerinden 200 µL alınarak kullanılmıştır ve oda sıcaklığında (23±2 °C) gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi elde edilirken deneyler en az 4 numune (n = 4) olacak şekilde tekrar edilmiş, ortalamaları alınarak standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

3.2.4. Modifiye Edilen Elektrotların Optimizasyon Çalışmaları

Seçilen yöntem ile elektron taşıyıcısının yüzeyde olmasının, enzim miktarının optimize edilmesinin ve polimerle film oluşturarak malzemeleri SPE'nin yüzeyinde hapsetmenin elektrokimyasal olarak performansı arttıracığı öngörülmüştür. Modifiye edilen elektrotların cevap süresini belirlemek için farklı zaman aralıklarında test işlemleri gerçekleştirilmiştir. Farklı sürelerde yapılan deneyler sonucunda en uygun cevap süresi olarak 120 s belirlenmiştir. Belirlenen süreye göre kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

3.2.4.1. Ferrosen Miktarının Optimizasyon Çalışmaları

Çözeltide kullanılacak olan Fc miktarını optimize etmek için 25 mM ve 50 mM Fc SPE'lere kaplanmıştır ve enzim tutuklanması için GOx (1 mg/mL) 1 µL damlatılarak kullanılmıştır. Son olarak 0,1 M asetik asit içerisinde %1 g/mL Chit SPE/CTT-Fc/GOx ve SPE/CPW-Fc/GOx çalışma elektrotu üzerine 2 µL damlatılarak yüzeyde ince bir film oluşturulmuştur. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ile modifikasyonu gerçekleştirilmiş elektrotların glikoz varlığında ve yokluğundaki aktivitesi elektrokimyasal olarak test edilmiştir.

3.2.4.2. Glikoz Oksidaz Enzimi Konsantrasyonu Optimizasyon Çalışmaları

Hazırlanan SPE/CTT-Fc ve SPE/CPW-Fc elektrolara enzim tutuklanması için GOx enzimi farklı konsantrasyonlarda kullanılarak en uygun enzim çalışma koşulu optimize edilmiştir. Kullanılan enzim konsantrasyonları sırasıyla 1 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL ve 40 mg/mL'dir. Enzim tutuklama yöntemi Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Ardından zaman kaybetmeden SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit glikoz varlığında ve yokluğundaki aktivitesi elektrokimyasal olarak test edilmiştir.

3.2.4.3. CA Analizi İçin Uygulanacak Potansiyelin Optimizasyonu

CA analizi için hassas ve doğru akım ölçümleri yapan tekrar edilebilirliği ve hassasiyeti en uygun olan potansiyel değerini belirleyebilmek için optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun için farklı potansiyel değerleri uygulanarak kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir ve ölçümler sonucunda korelasyon değeri ve duyarlılıkları karşılaştırılarak analizlerde uygulanacak potansiyel seçilmiştir.

3.2.5. Modifiye Edilen Biyosensörün Performans Analizleri

3.2.5.1. Tekrar Kullanılabilirlik ve Tekrar Üretilirliğin İncelenmesi

Aynı koşullarda yapılan art arda analizlerde sonuçların birbirine yakın elde edilmesi yani geliştirilen biyosensörün tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirliğinin iyi olması analizlerin doğru şekilde yapılması açısından oldukça önemlidir. Hazırlanan biyosensörlerin tekrar kullanılabilirliğini tespit etmek için optimize edilmiş çalışma şartları altında hazırlanan aynı elektrot kullanılarak belirlenen glikoz konsantrasyonu ve çalışma potansiyelinde elde edilen akım değerleri kaydedilerek bağıl standart sapması (%RSD) hesaplandı ve tekrar kullanılabilirlik sayısı incelendi. Tekrar üretilebilirliği incelemek amacıyla aynı koşullarda hazırlanan on farklı elektrot kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi ve akım farklarındaki bağıl standart sapmaları hesaplanarak tekrar üretilebilirlik incelendi.

3.2.5.2. Girişim Etkisi

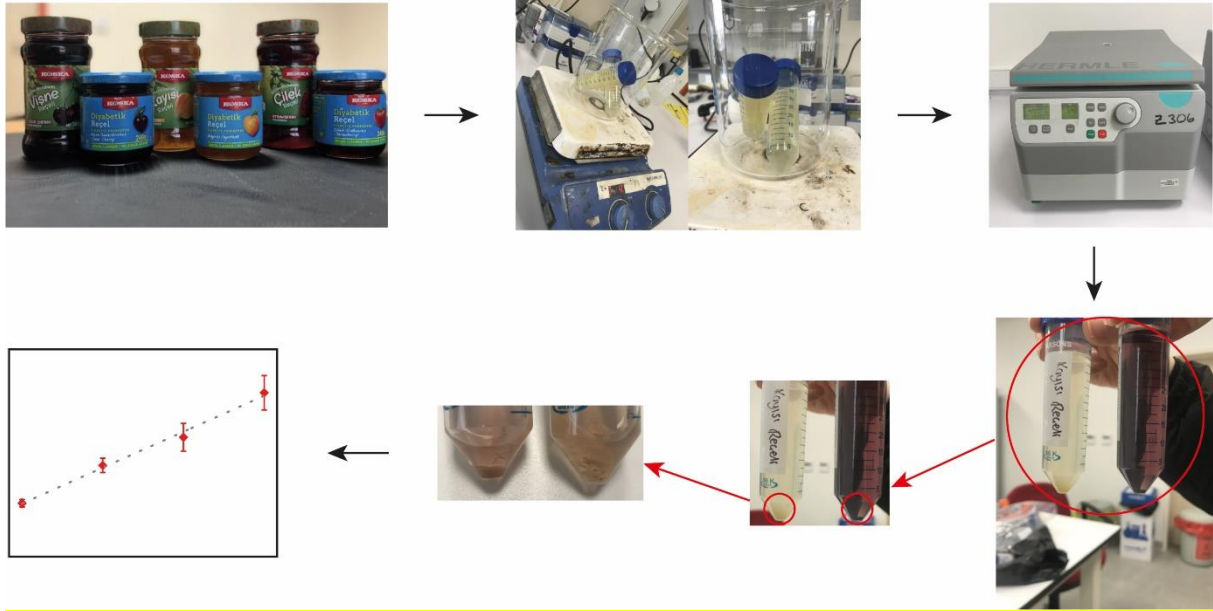
Optimizasyonu gerçekleştirilen biyosensörün glikoz saptanmasına müdahale eden, glikozun bulunduğu örneklerde bulunabilen askorbik asit, ürik asit ve insülin gibi maddelerin girişim etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 0,15 mM ürik asit (UA), 5 mM glikoz, 0,15 nM insülin (Ins), 0,45 µM askorbik asit (AA) ve bir adet karışım kullanılmıştır. Biyosensörün akım değişimleri incelenerek glikoza karşı ne kadar seçici olduğu belirlenmiştir.

3.2.5.3. Gerçek Numune Uygulaması

Bu tez çalışmasında, modifikasyonu gerçekleştirilen biyosensör ile ülkemizde ticari olarak üretim yapan KOSKA firmasının bize sağladığı üçü 380 g'lık ekstra geleneksel ve üçü 240 g'lık diyabetik olarak üretildiği belirtilen reçellerin glikoz analizi gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak satılan ekstra geleneksel reçel: Su ile bütün veya parçalı meyvelerin veya bitkilerin kök, yaprak, çiçek gibi yenilebilen kısımlarının şeker ilave edilerek veya edilmeden belirli kıvamda getirilmiş, geleneksel reçele oranla daha fazla meyve veya bitki parçası içeren karışımı olarak tanımlanmıştır (Cemal vd, 2012). Şeker tayini yapılacak numunenin homojen olması gereklidir. Eğer numune posalıysa belirli miktarda su örnekle karıştırılır ve tartılarak homojenlik sağlanır. Reçel, konserve ve marmelat gibi ürünlerde bu yöntem kullanılır (Cemeroğlu, 1992).

Gerçek numune analizi için 10 g reçel hassas terazi ile tartılıp PBS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dakika boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra 4000 rpm ile 6 dakika boyunca santrifüj gerçekleştirilmiştir. Son

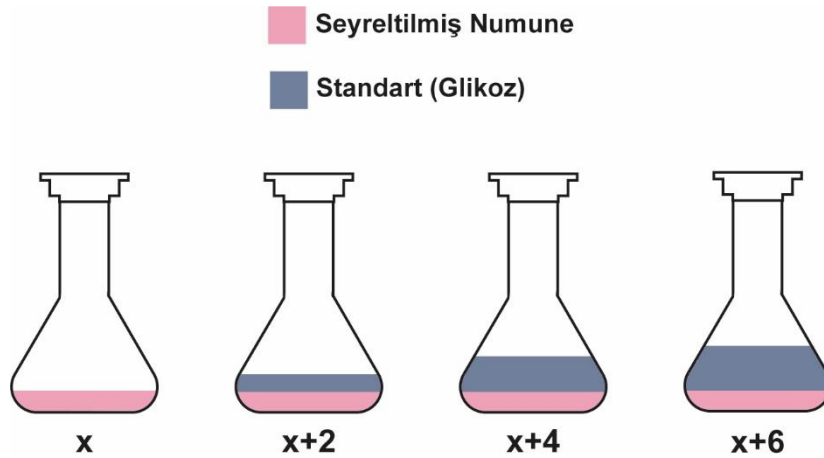
olarak analiz gerçekleştirilmeden önce 0,45 μ M filtreden geçirilerek stok çözelti hazırlanmıştır (Şekil 3.12). Örneklerdeki glikoz miktarının belirlenmesi için standart ekleme ve kalibrasyon yöntemi kullanılarak farklı reçeller için analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler +0,100 V potansiyel uygulanarak 120 s sonundaki akım değeriyle bir grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.12. Modifikasyonu gerçekleştirilen biyosensöre gerçek numune uygulaması

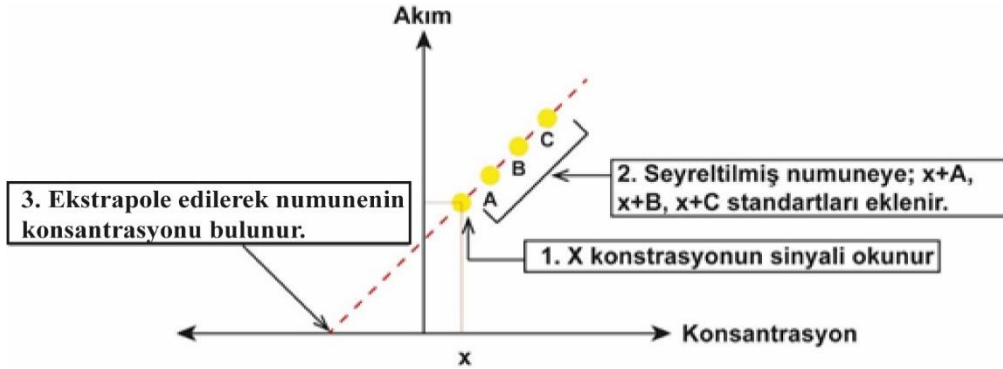
Standart ekleme yöntemiyle çizilen grafiklerden elde edilen x konsantrasyonu kalibrasyon grafiğinde kullanılarak glikoz derişimi tahmin edilmiştir. Standart eklemeler için gerçekleştirilen adımlar şu şekildedir ;

- i. Numune, aynı hacme sahip ayrı hacimsel şişelerde birkaç eşit parçaya bölünür ve seçilen seyreltici (PBS) ile belirlenen hacme seyreltilerek stok çözelti hazırlanır.



Şekil 3.13. Analiz için numunelerin hazırlanması

- ii. Çalışmada 4 adet 1,5 mL'lik eppendorf marka tüp kullanılmıştır. Her tüpe seyreltilen numune aynı hacimlerde bölünür. Ardından sırasıyla 2 mM, 4 mM ve 6 mM glikoz tüplere eklenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.14. Standart ekleme grafiğinin hazırlanış aşamaları

- iii. Ardından her bir tüpe belirli miktarlarda standart (glikoz) eklenir. Daha sonra tüm seyreltilmiş numuneler için cihaz yanıtı ölçülür ve veriler, x ekseninde eklenen hacim standardı ve y ekseninde cihaz yanıtı ile çizilir (Şekil 3.14).
- iv. Lineer regresyon gerçekleştirilir ve numunedeki analit konsantrasyonunu hesaplamak için kalibrasyon eğrisinin eğimi ve y-kesme noktası kullanılarak analit konsantrasyonu hesaplanabilir.

3.2.5.4. Raf Ömrü

Modifikasyonu gerçekleştirilen biyosensörlerin raf ömrünün belirlenebilmesi için 30 gün boyunca belirli aralıklarla akım değerleri ölçülmüştür. Aynı şartlarda hazırlanarak 4°C'de saklanarak farklı günlerde (1, 7, 14 ve 30 gün) 5 mM ve 10 mM glikoz konsantrasyonlarına verdiği cevaplar CA tekniğiyle izlenmiştir. Deneyler en az 4 numune (n=4) olacak şekilde tekrar edilmiş, ortalamaları alınarak standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Testi gerçekleştirilen biyosensör tampon çözeltiyle yıkanarak tekrar +4°C'de saklanmıştır.

3.2.6. Katot Hazırlanması ve Yakıt Hücresi Karakterizasyonu

Katot Hazırlanması

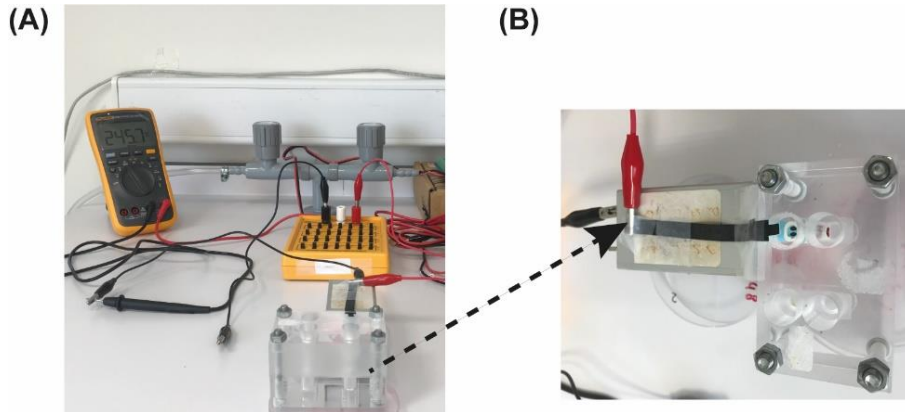
Yakıt hücresinin katodunda Sigma-Aldrich firmasının satın alınan platin karası (Platinum Black, PtB) kullanılmıştır. PtB için DMF (dimetilformamid), etanol ve ultra saf su çözücülerıyla çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan PtB çözeltisi SPE yüzeyine farklı miktarlarda kaplanarak SPE/PtB yüzeyi analiz edilmiştir. Hazırlanan SPE/PtB'nin oksijen varlığında ve yokluğunda performansını inceleyebilmek için 0,1 M PBS ilk olarak azota, daha

sonra havaya doyurulup 0,7 – 0 V (vs Ag/Ag⁺) aralığında 1 mV potansiyel adımı ve 20 mV/s tarama hızında LSV tekniği kullanılarak elektrokimyasal olarak test edilmiştir.

Yakıt hücresi karakterizasyonu için anodu SPE/CTT-Fc/Chit ve SPE/CPW-Fc/Chit olan katodu SPE/PtB olan enzimatik yakıt hücresi hazırlanmış ve polarizasyon eğrileri elde edilerek performans analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarında SPE'lerin düşük yüzey alanından dolayı yakıt hücresinin performansını kısıtladığı görülmüştür. Hazırlanan yakıt hücresinin performansının katot tarafından kısıtlanmaması için PtB kaplanmış gaz difüzyonlu karbon elektrot (Gas Diffusion Electrode, GDE) kullanılmıştır. PtB 0,15 cm² alana üzerine maksimum malzeme doluluğu sağlanacak şekilde kaplanmıştır. GDE kullanılarak ve birim alan başına maksimum malzeme yoğunluğu sağlanarak yakıt hücresi performansının katot tarafından kısıtlanmaması sağlanmıştır. Yakıt hücresinin katodu GDE/PtB olarak simgelenmiştir.

Enzimatik yakıt hücresi karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında enzimatik yakıt hücresinin geliştirilen yöntemle Şekil 3.15'te gösterilen sistem düzeneği kurularak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda 5 mM glikoz çözeltisiyle enzimatik yakıt hücresinin ürettiği potansiyel fark dijital multimetreyle ölçülmüştür. Enzimatik yakıt hücrelerinin polarizasyon eğrileri ve kararlılığı incelenerek karbonize malzemelerin yakıt hücrelerinde kullanıldığında performans analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.15. (A) Enzimatik yakıt hücresi için kullanılan sistem düzeneği (B) Enzimatik yakıt hücresi

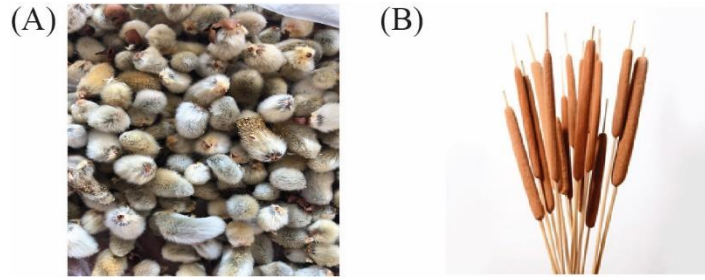
Polarizasyon eğrileri enzimatik yakıt hücresinin anot ve katodu arasında farklı yükler bindirilerek (direnç eklenerek) elde edilmiştir. Bu eğrileri oluşturmak için devreye değişken bir dış direnç kutusu seri bağlanmış ve farklı direnç değerleri için enzimatik yakıt hücresinde oluşan potansiyel farklar ölçülmüştür. Ohm Yasası ($V = I \times R$) kullanılarak elde edilen

potansiyel değerlerinden g¼c değerleri ($P = I \times V$) hesaplanarak polarizasyon eğrileri elde edilmiştir. Son olarak enzimatik yakıt h¼cresinin potansiyeli, seçilen g¼c değerinde kararlılık testine tabi tutularak zamanla g¼c değerindeki değişim incelenmiştir. Hazırlanan enzimatik yakıt h¼crelerine SPE/CTT-Fc/Chit anodu ve GDE/PtB katoduna 80 k Ω direnç, SPE/CPW-Fc/Chit anodu ve GDE/PtB katoduna 100 k Ω direnç uygulanarak 24 saat boyunca maksimum g¼c değerleri elde edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR

4.1. Biyokütleden Karbonize Malzeme Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında literatür taraması yapıldıktan sonra belirlenen iki farklı biyokütle kaynağından karbonizasyon yöntemiyle karbon malzeme sentezleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Belirlenen malzemelere ait görseller Şekil 4.1'de verilmiştir. Karbonizasyon işlemi hasır otu püskülü ve kedi söğüdü biyokütle kaynaklarının tüp fırın kullanılarak literatüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Erkal vd, 2016).



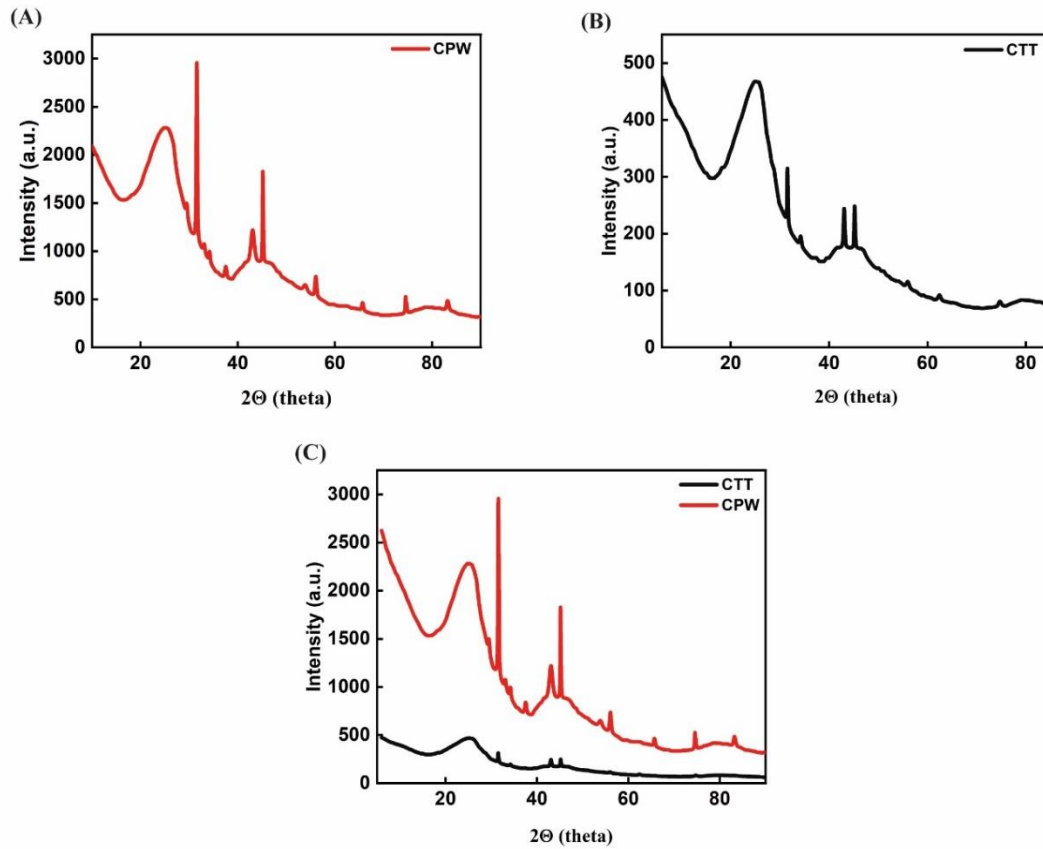
Şekil 4.1. (A) Kedi söğüdü ve (B) Hasır otu

Analizlere ait süreçler sırasıyla aşağıda açıklanmıştır.

1. İşleme başlamadan önce seçilen biyokütlenin lifleri (püsküllerini) ayrılmıştır.
2. Biyokütleyi fırına yerleştirmeden önce fırının içindeki oksijen azot gazı verilerek uzaklaştırılmıştır.
3. Seçilen biyokütleden elde edilen lifler bir kaba alınarak ısı kalkanyla birlikte fırının tam ortasına yerleştirilmiştir.
4. Yukarıda bahsedilen işlemler bittikten sonra karbonizasyon işlemi için fırın sıcaklığı aşağıdaki gibi değiştirilmiştir;
 - a. 60 dakika da fırın sıcaklığı 1000 C° çıkarılmaktadır.
 - b. 60 dakika boyunca fırın sıcaklığı 1000 C° kalmaktadır.
 - c. Son olarak fırın sıcaklığı düşürülerek soğutulma işlemi gerçekleştirilmektedir.

Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında sentezlenen CTT ve CPW malzemelerinin fiziksel özellikleri XRD, FTIR, SEM/EDX ve Mapping analiz yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Karbonizasyon yöntemiyle sentezlenen CTT ve CPW malzemelerinin moleküler faz yapılarını için kullanılan XRD analizleri, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki Panalytical Empyrean Ht-Xrd cihazıyla $2\theta=5^\circ-90^\circ$ aralığında

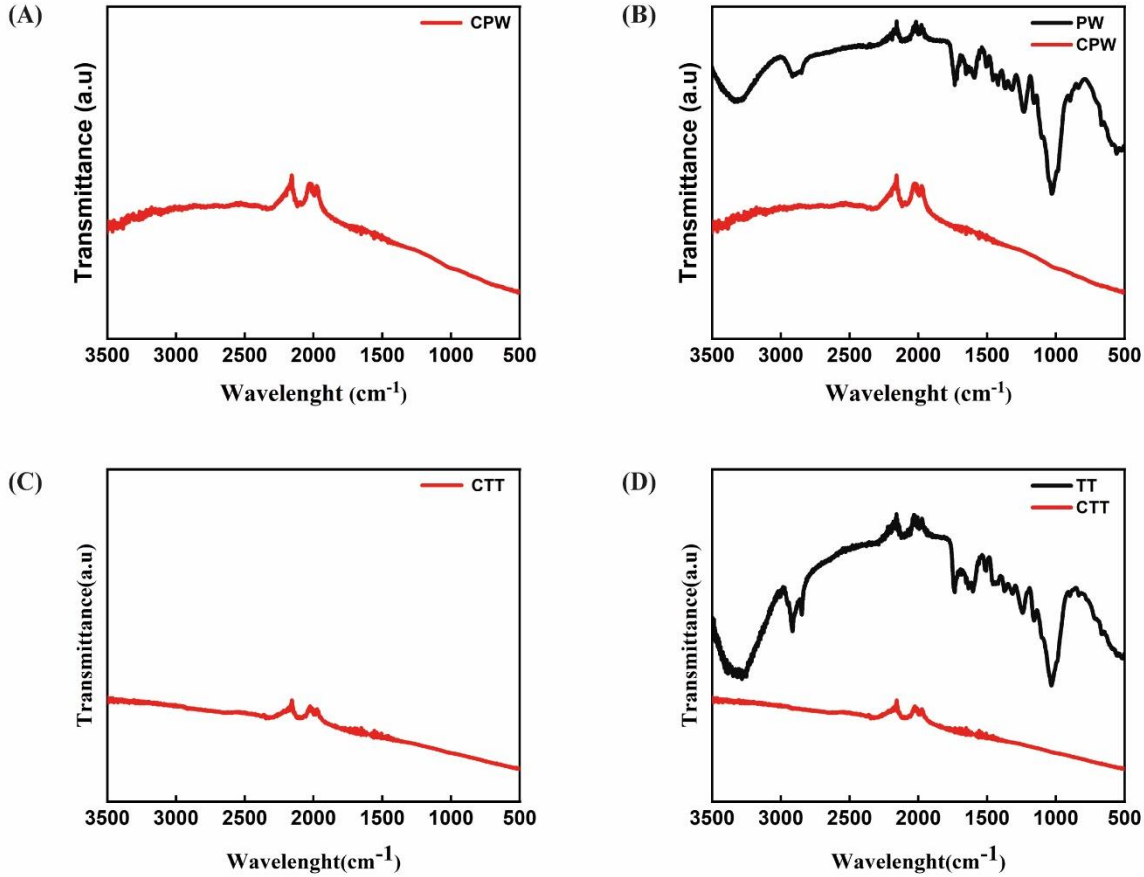
gerçekleştirilmiştir. Karbonizasyon sonrası malzemelere ait geniş açı XRD analiz sonuçları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. (A) CPW malzemesine ait geniş açı XRD kırınım diyagramları, (B) CTT malzemesine ait geniş açı XRD kırınım diyagramları, (C) CTT ve CPW malzemelerinin XRD kırınım diyagramları

Biyokütller için literatürde yapılan XRD analizleri incelendiğinde, $2\Theta=18-28^\circ$ arasındaki amorf yapı selüloz içerisinde yer alan hidrojen bağlarıyla ilişkilendirildiği görülmüştür (Bandodkar vd, 2017; Güleşen vd, 2019; Hovancová vd, 2017; X. Li vd, 2018; Panjan vd, 2017; Semenova vd, 2018; Zare vd, 2017; L. X. Zhang vd, 2015). Şekil 4.2'de görüldüğü gibi her iki biyokütlenin karbonizasyonu sonrasında $2\Theta=27^\circ$, $40-45^\circ$, $50-60^\circ$ de elde görünen amorf ve kristal yapılar ise karakteristik grafit yapısını işaret etmektedir (Nanda vd, 2013). Birinci pik, karbon atomlarının (002) dizilimine aittir (Pawlyta vd, 2015). $40-45^\circ$ arasındaki desenler (100) ve (101) dizilimlerini göstermektedir. Üçüncü desen ise karbon atomlarının (004) dizilimini işaret etmektedir (Radoń ve Łukowiec, 2017). XRD analiz sonuçlarına göre, elde edilen temel Bragg piklerinin polikristalin karbon yapıya sahip literatüre ile uyumlu oldukları gözlenmiştir.

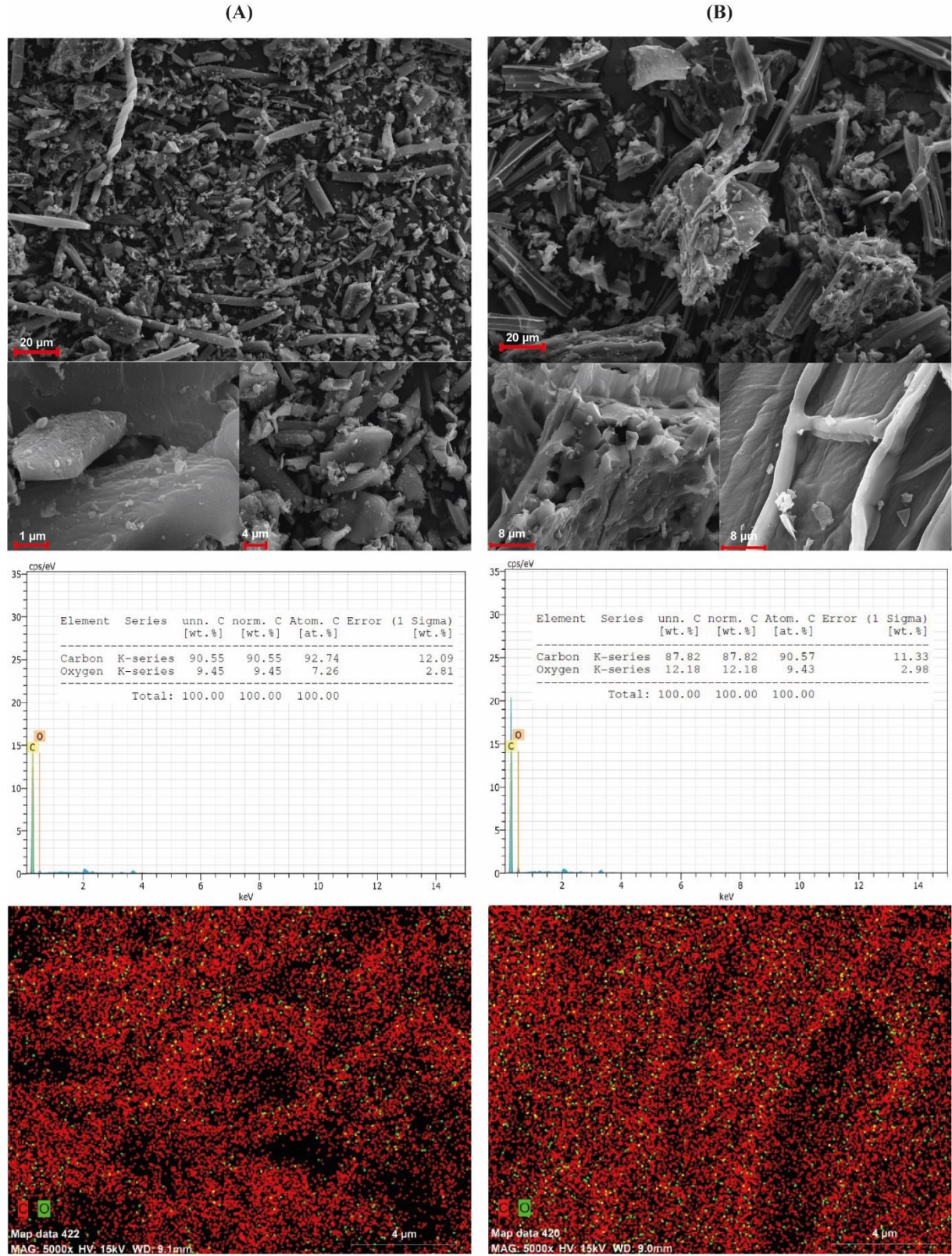
Bu çalışma kapsamında sentezlenen karbonize malzemelerin FT-IR analizleri Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Kimya mühendisliği Laboratuvarındaki Agilent Cary 360 marka IR cihazında; ATR tekniği kullanılarak 4000-300 cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen FT-IR analiz sonuçları Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. 3500-500 cm^{-1} spektrum aralığında FTIR analizleri: (A) CPW, (B) RPW ve CPW analiz karşılaştırılması, (C) CTT, (D) RTT ve CTT analiz karşılaştırılması

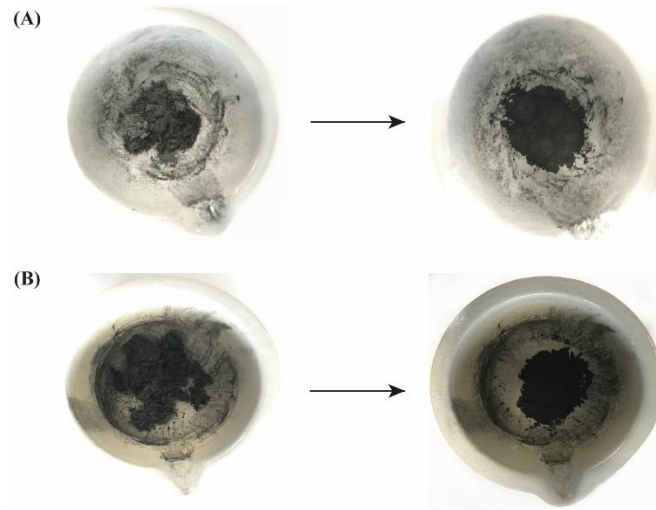
Karbonizasyon öncesi ve sonrası CTT ve CPW malzemelerinin FT-IR analiz sonuçları incelendiğinde, yaklaşık 3400-3500 cm^{-1} dalga boyları arasındaki yapı hidroksil gruplarının varlığını işaret etmektedir (Bhat vd, 2019; L. L. Zhang ve Zhao, 2009), O-H titreşimleri ise 2350 cm^{-1} dalga boyunda gözlenmiştir. 2845, 3110 cm^{-1} dalga boyları sırasıyla alifatik ve aromatik C-H gruplarına karşılık gelmektedir. Karbonil gerilme titreşimleri ise 1800-2100 cm^{-1} aralığında keskin bir pik olarak gözlenmiş ve aromatik C-H deformasyon bantları 750 ile 1100 cm^{-1} arasında belirlenmiştir (Nanda vd, 2013). Diğer yandan, karbonizasyon sonrası elde edilen CTT ve CPW'nin FTIR spektrumları incelendiğinde grafen ve grafit ile benzer karakteristik yapıya sahip olduğu söylenebilir (Naebe vd, 2014). Ayrıca, 1600-1700 cm^{-1}

arasında görünen zayıf pik ve titreşimler aromatik halka moduna ait C=C bağ formasyonunu ve dolayısıyla karbonize yapının oluştuğunu desteklemektedir.



Şekil 4.4. (A) CPW ve (B) CTT'nin SEM görüntüleri ve EDX & Mapping analizi

Sentezlenen malzemelere analiz öncesinde vakum altında platinle kaplanarak elektriksel iletkenlik kazandırılmış ve analizler numunelere platin kaplanarak gerçekleştirilmiştir. TT ve PW malzemelerine ait elde edilen analiz sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir. Gerçekleştirilen SEM analiz sonuçlarına göre, biyoelektronik uygulamalar için önemli olan iki boyutlu yüzey alanlarının birbirine bağlı karbonlu liflerle karbon bağlantılarının polikristal-karbon yapılarıyla elde edildiği gözlenmiştir. Karbonizasyon sonrası elde edilen SEM görüntülerinin literatürle uyumlu oldukları gözlenmiştir (Şahin, 2019). EDX analiz sonuçlarına göre PW ve TT karbonize ürünlerine ait C (karbon) içeriklerinin birbirine yakın oldukları belirlenmiştir. Karbonize ürünlerdeki C (karbon) ve O (oksijen) elementlerinin dağılımları Mapping analiz yöntemiyle belirlenmiş elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir. Sonuçların EDX sonuçlarıyla uyumlu olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.5. Öğütülme işlemi gerçekleştirilen (A) CTT'nin önceki ve sonraki, (B) CPW'nin önceki ve sonraki işlem basamakları gösterilmiştir.

Karbonizasyon işlemi sonucunda sentezlenen CTT ve CPW malzemelerinin farklı çözücülerle oluşturdukları dispersiyonlar incelenmiştir. Dispersiyon işlemleri gerçekleştirilmeden önce karbonize malzemeler önce öğütülüp daha sonra ise elekten geçirilmiştir (Şekil 4.5). Dispersiyon işlemleri farklı ağırlıklarda (12 mg-20 mg) ve sabit çözücü hacminde yapılmıştır. Gerçekleştirilen dispersiyon işlemleri iki farklı çözücü kullanılarak denlenmiştir ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Dispersiyon işlemi ultrasonik banyo kullanılarak her iki malzeme için eşit şartlarda gerçekleştirilmiştir ve belirli aralıklarla değerlendirilerek 3 saatin sonunda CTT ve CPW'nin DMF içerisinde disperse olduğu görülmüştür. Ertesi gün ve günler arası incelenmek üzere

bırakılan süspansiyonlarda deneye başlamadan önce 15 dakika ultrasonik banyoda bekletmenin malzemenin çökmesini engellediği görülmüştür.

Tablo 4.1. 6 mg/mL için karbonize malzemelerin iki farklı çözücüde (Etanol ve DMF) dispersiyonu

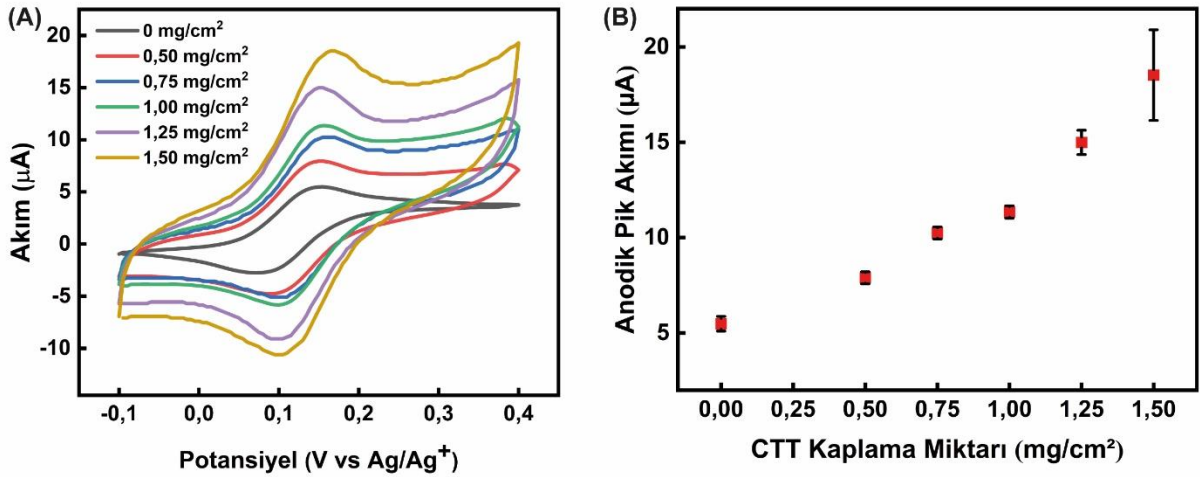
Karbonize Malzeme (6 mg/mL)	DMF	Etanol
CTT	✓	X
CPW	✓	X

Tablo 4.2. 10 mg/mL için karbonize malzemelerin iki farklı çözücüde (Etanol ve DMF) dispersiyonu

Karbonize Malzeme (10 mg/mL)	DMF	Etanol
CTT	✓	X
CPW	✓	X

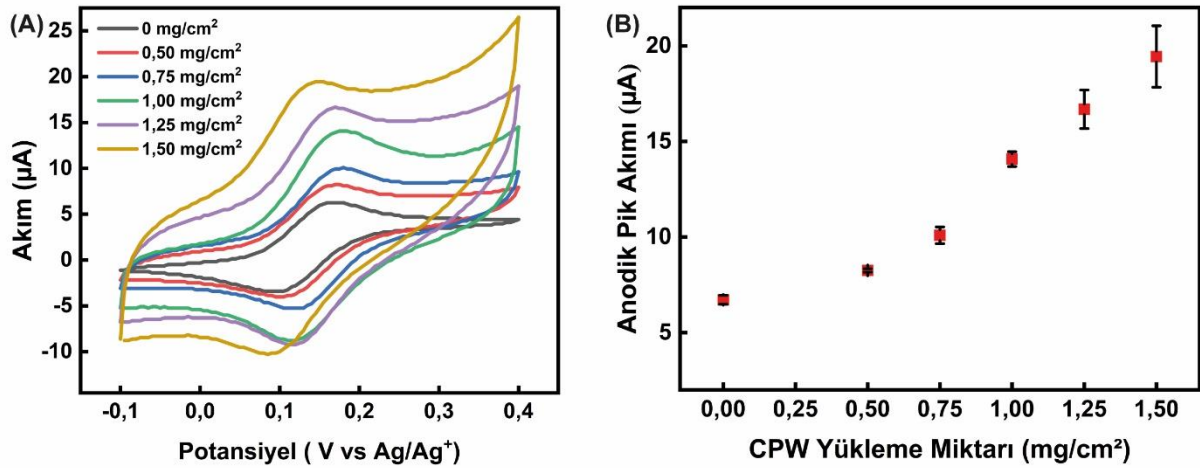
4.2. Karbonize Malzemelerin SPE'lere Kaplanması ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında elektrokimyasal temizlik işlemi Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Kaplamalarda CTT-DMF ve CPW-DMF süspansiyonları kullanılmıştır ve Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen CV eğrileri Şekil 4.6 ve 4.7'de verilmiştir. CTT ile yapılan kaplama miktarı sonucu elde edilen CV sonuçları Şekil 4.6 (A)'da gösterilmiştir. Görüldüğü gibi pik akım değeri malzeme kaplanmamış hale göre malzeme 1,5 mg/cm² yoğunluğunda kaplandığında yaklaşık 3,4 kat artmıştır. Fakat yüksek kaplama miktarları kaplamanın fiziksel olarak zor olması ve malzeme taşınması nedeniyle test edilememiştir.



Şekil 4.6. (A) CTT'nin SPE'ler üzerine farklı kaplama miktarıyla kaplanması sonucu oluşan CV akım yanıtları gösterilmektedir. Tüm deneyler 50 mV/s tarama hızında FcCOOH ile gerçekleştirilmiştir. (B) SPE ve SPE/CTT kaplı elektrotların elde edilen anodik pik akım değerleri verilmiştir.

Kaplamada kullanılan SPE'nin sınırlı yüzey alanı nedeniyle belirli bir yoğunluğun üzerinde CTT ile kaplandığında kaplama merkeze birikmiştir. Malzemenin elektrot yüzeyi ile zayıf etkileşimi nedeniyle yapılan elektrokimyasal testlerde sızıntılar ve dolayısıyla malzeme kaybı olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, Şekil 4.6 (B)'de görüldüğü üzere düşük hata payına sahip en yüksek akım değerini sağlayan 1 mg/cm² malzeme yoğunluğu enzim deneyleri için optimum olarak seçilmiştir. Seçilen malzeme yoğunluğunda akım değeri kaplanmamış SPE'ye göre yaklaşık 2 kat artmıştır.



Şekil 4.7. (A) CPW'nin SPE'ler üzerine farklı kaplama miktarıyla kaplanması sonucu oluşan CV akım yanıtları gösterilmektedir. Tüm deneyler 50 mV/s tarama hızında FcCOOH ile gerçekleştirilmiştir. (B) SPE ve SPE/CPW kaplı elektrotların elde edilen anodik tepe akım değerleri verilmiştir.

Şekil 4.7’de CPW kaplandığı zaman yapılan deneyler sonucunda elde edilen elektrokimyasal akım değerleri gösterilmektedir. Akım değerleri CTT ile benzer davranış göstermiş olup, kaplanmamış hale göre malzeme 1,5 mg/cm² yoğunluğunda kaplandığında yaklaşık 2,9 kat artmıştır.

Dolayısıyla, CTT ve CPW ile yapılan deneylerden elde sonuçlara göre benzer elektrokimyasal performans elde edilmiştir. SEM, EDX ve Mapping sonuçları da elektrokimyasal deney sonuçlarıyla beraber değerlendirildiğinde malzemelerin benzer yapılarla sahip olduğu değerlendirilmiştir. CPW’nin elektrot yüzeyi ile zayıf etkileşimi nedeniyle yapılan elektrokimyasal testlerde sızıntılar ve dolayısıyla malzeme kaybı olduğu gözlemlenmiştir. CTT’ye benzer olarak CPW için de düşük standart sapma ve kaplamanın zorlukları sebebiyle yapılacak olan enzim deneyleri için optimum yükleme miktarı olarak 1 mg/cm² seçilmiştir. Akım değeri seçilen malzeme yoğunluğunda kaplanmamış SPE’ye göre yaklaşık 2 kat artmıştır. Her iki malzeme için de daha düşük bir kaplama miktarı seçilmesinin bir başka nedeni ise, CTT ve CPW kaplı elektrotlar için maksimum denenen malzeme miktarında (1,5 mg/cm²) tekrar edilen deneylerin standart sapmalarının çok fazla artmış olmasıdır.

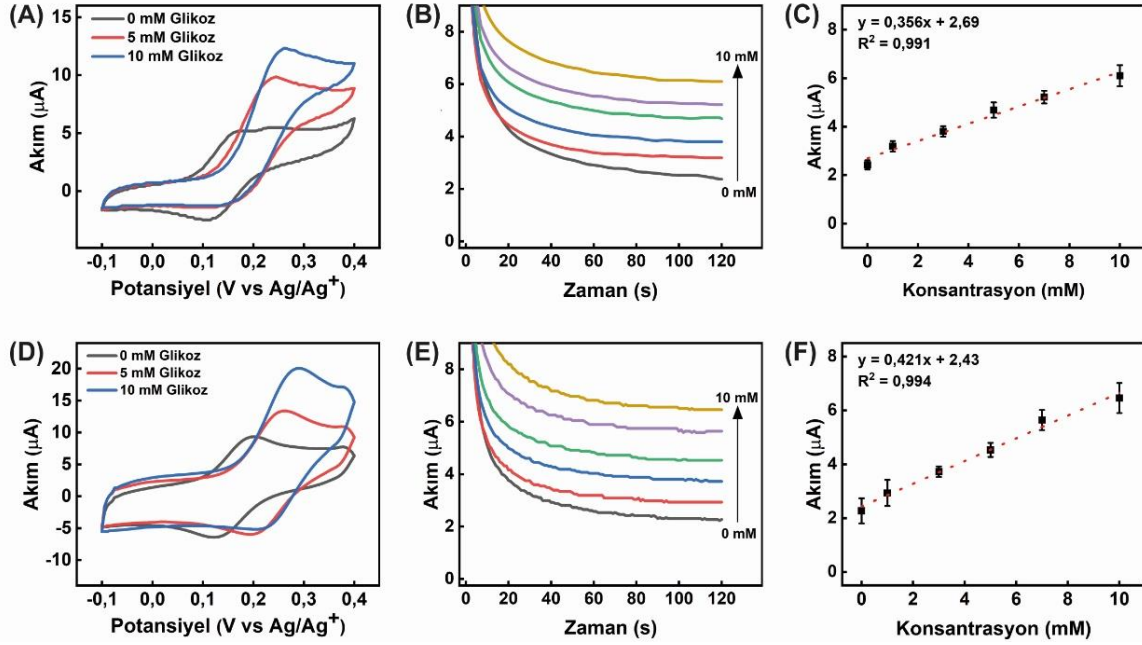
4.3. Enzimatik Elektrotların Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında biyosensör uygulamalarında kullanılmak üzere enzim temelli elektrotlar hazırlanmıştır. Geliştirilen elektrotlar için en uygun çalışma koşulunu belirleyebilmek için dört farklı enzim tutuklama yöntemi geliştirilmiştir. Optimizasyon sonuçlarına göre elde edilen kalibrasyon grafikleriyle enzim temelli elektrotların kinetik parametreleri (K_m , V_{max}) hesaplanmıştır.

4.3.1. SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx Elektrotların Modifikasyonu

Hazırlanan SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx elektrotların farklı glikoz konsantrasyonuna karşı elde edilen elektrokimyasal akım değişimi CV ve CA yöntemleri ile incelenmiştir. Şekil 4.8 (A) ve Şekil 4.8 (D) ’de CV tekniğiyle 20 mV/s tarama hızında -0,1-0,4 V (vs Ag/Ag⁺) potansiyel aralığında 5 ve 10 mM glikoz konsantrasyonlarında elde edilen voltamogramlar gösterilmektedir. Anodik ve katodik akım pikleri incelendiğinde enzimin glikoz ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan elektronların akım değerini arttırması nedeniyle enzimin başarılı bir şekilde SPE/CTT ve SPE/CPW’ye tutuklandığı görülmektedir.

Şekil 4.8 (B) ve Şekil 4.8 (E)'de SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx elektrotların CA tekniğiyle 120 saniye boyunca 0,3 V (vs Ag/Ag⁺) uygulanarak sırasıyla 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM ve 10 mM glikoz konsantrasyonlarına verdiği cevaplar incelenmiştir. Grafikte görüldüğü üzere artan glikoz konsantrasyonuyla beraber akım değişimi doğrusal olarak artmıştır.

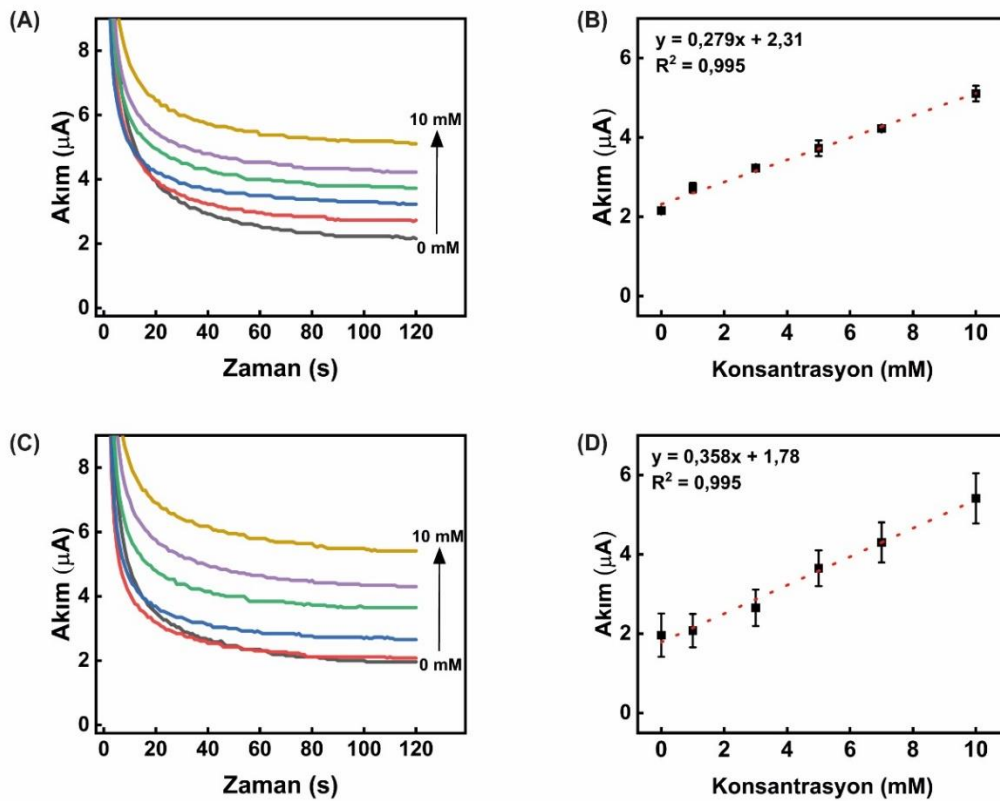


Şekil 4.8. SPE/CTT/GOx elektrotun (A) CV, (B) CA, (C) kalibrasyon eğrileri ve SPE/CPW/GOx elektrotun (D) CV, (E) CA, (F) kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CV (tarama hızı: 20 mV/s) ve CA (V = 0,3 (vs Ag/Ag⁺)) analizleri 1 mM FcCOOH içerisine eklenen farklı glikoz konsantrasyonlarıyla gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.8 (C) ve Şekil 4.8 (F)'de hazırlanan biyosensörlerin farklı glikoz konsantrasyonlarında verdiği akım cevapları incelenerek bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. CTT ve CPW ile modifiye edilmiş elektrotların 0-10 mM glikoz konsantrasyonundaki akım değişimi doğrusal bir denklemle verilmiştir ve çok yüksek korelasyon değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Grafikler incelendiğinde tasarımı gerçekleştirilen biyosensörlerin 0 mM ile 1 mM arasında akım değer aralığı az olduğu için bu elektrot konfigürasyonu için düşük konsantrasyonlarda hassas ölçüm yapılamayacağını görülmüştür. Glikoz yokluğunda benzer akım cevapları alsalar da konsantrasyon arttıkça CPW malzemesi ile yapılmış biyosensörün duyarlılığının (doğrusal denklemin eğimi olarak alınmıştır) daha fazla olduğu görülmektedir. CTT malzemesinin duyarlılığının az olmasının sebebinin ise çözelti içerisinde test edilirken yaşanan malzeme kaybı olduğu düşünülmektedir.

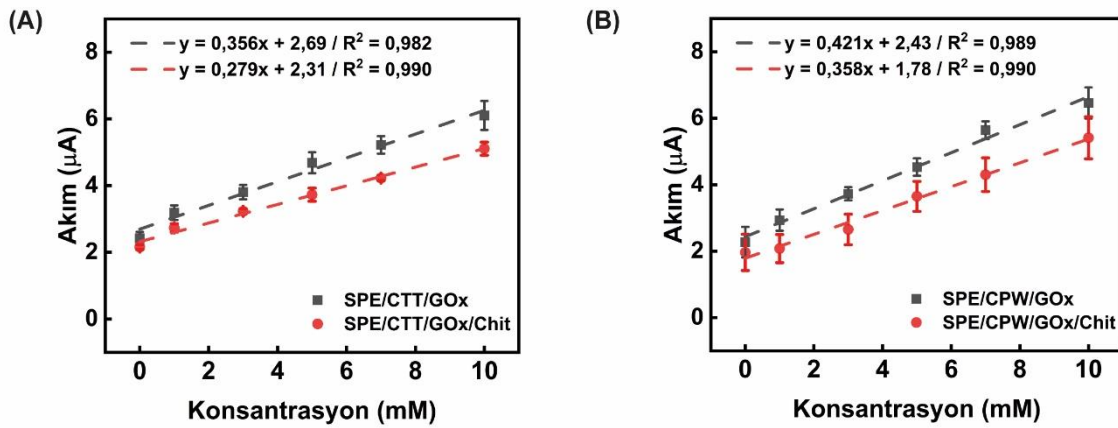
4.3.2. SPE/CTT/GOx/Chit ve SPE/CPW/GOx/Chit Elektrotların Modifikasyonu

Gerçekleştirilen modifikasyon yönteminde enzim tutuklama işlemi için fiziksel adsorpsiyon ve hapsedme kullanılmıştır. Bu yöntemin tercih edilmesinin sebebi uygun bir taşıyıcı ile ucuz ve kolay olmasıdır (Krajewska, 2004). Ancak fiziksel adsorpsiyonun en büyük dezavantajı enzim ve taşıyıcı arasında oluşan zayıf kuvvetlerden dolayı adsorbe olmuş enzimin yüzeyden kolayca ayrılmasıdır. Bölüm 4.3.1.'deki sonuçlar incelendiğinde, test aşamasında yaşanan malzeme kaybı ve tutuklanmış enzimin yüzeyden ayrılmasından dolayı sensörlerin hassasiyetinin düşük olduğu düşünülmektedir. Enzim tutuklama yönteminin kararlılığını ve dayanıklılığını artırması için seçilen bir destek ile tutuklanan enzimin performansı önemli ölçüde artmaktadır. Enzimler için genel bir destek materyali olmadığı bilinmekle birlikte ortak istenilen bazı özellikler vardır. Bunlar; proteinlere yüksek afinite, mekanik stabilite ve sertlik, sisteme geçirgenlik ve uygun yüzey alanı sağlayan farklı geometrik konfigürasyonlarda yeniden üretilebilirlik ve hazırlama kolaylığıdır (Krajewska, 2004). Ayrıca artan halk sağlığı ve çevre kirliliğine yanıt verebilmek için kullanılan materyaller biyolojik olarak parçalanabilir, ekonomik ve ucuz olmalıdır.



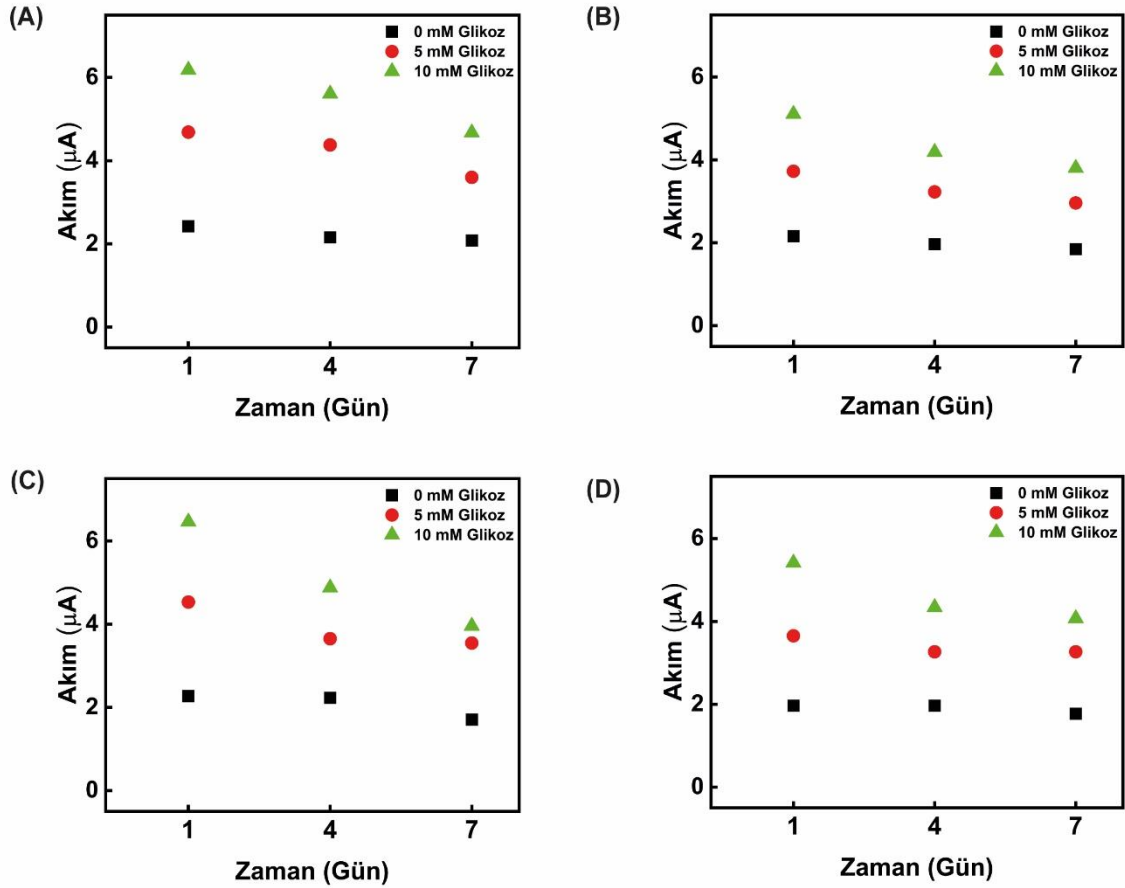
Şekil 4.9. SPE/CTT/GOx/Chit elektrotun (A) CA, (B) kalibrasyon eğrileri ve SPE/CPW/GOx/Chit elektrotun (C) CA, (D) kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) analizleri 1 mM FcCOOH içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir.

Chit bu özelliklerin çoğunu sunduğundan dolayı geliştirilen yöntem de kullanmak için uygundur. Bu amaçla SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx üzerine Chit damlatılarak yüzeyde ince bir film oluşturulmuştur. Şekil 4.9'da SPE/CTT/GOx/Chit ve SPE/CPW/GOx/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların değişen glikoz derişimine verdiği tepki CA tekniği ile incelenmiştir. Şekil 4.9 (A) ve Şekil 4.9 (C)'de hazırlanan sensörlerin 1 mM FcCOOH içerisinde eklenen glikoz konsantrasyonlarına verdiği akım değişimleri incelenmiştir. Her iki grafik incelendiğinde, akım değişimi 1-10 mM glikoz konsantrasyonu aralığında doğrusal şekilde artmıştır. Şekil 4.9 (B) ve Şekil 4.9 (D)'de ise alınan amperometrik sonuçlarda glikozun artan varlığında elektrotun göstermiş olduğu akım değerleri ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve doğrusal denklem ile verilmiştir. CTT ve CPW ile modifiye edilmiş elektrotların 0-10 mM glikoz konsantrasyonundaki akım değişimi doğrusal bir denklemle verilmiştir ve yüksek korelasyon değerlerine sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.10. (A) SPE/CTT/GOx ve SPE/CTT/GOx/Chit (B) SPE/CPW/GOx ve SPE/CTT/GOx/Chit elektrotlarının kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılmıştır.

Gerçekleştirilen modifikasyonlar sonucunda CTT ve CPW malzemeleri için geliştirilen yöntemler kıyaslanmıştır (Şekil 4.10). Şekil 4.10 (A)'da kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemler incelendiğinde hassasiyetin %22 azaldığı ve 0-10 mM glikoz konsantrasyonu arasında SPE/CTT/GOx'de akımın 1,52 kat, SPE/CTT/GOx/Chit'da ise 1,37 kat arttığı görülmüştür. Şekil 4.10 (B)'da kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemler incelendiğinde hassasiyetin %15 azaldığı ve SPE/CPW/GOx'de akımın 1,85 kat, SPE/CPW/GOx/Chit'da ise 1,76 kat arttığı görülmüştür. SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx ile modifiye edilmiş elektrotlara Chit damlatıldıktan sonra çok büyük akım değişimleri yaşanmamıştır; fakat sensörlerin hassasiyetinde bir değişim olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, 0 mM glikoz konsantrasyonunda benzer akım cevapları elde edilmiştir.



Şekil 4.11. (A) SPE/CTT/GO_x, (B) SPE/CTT/GO_x/Chit ve (C) SPE/CPW/GO_x, (D) SPE/CTT/GO_x/Chit elektrotlarının depolama kararlılığı. 5 mM ve 10 mM glikoza verilen yanıtlar, elektrotlar 0,1 M PBS tamponunda 4 °C’de saklanırken farklı günlerde (1, 4 ve 7 gün) izlenmiştir.

Şekil 4.10 (A) ve (B) incelendiğinde ise 0 mM glikoz konsantrasyonunda benzer akım tepkileri alınmasına rağmen glikoz konsantrasyonu arttıkça akımın arttırmamasının sebebinin olası bir difüzyon problemi olabileceği öngörülmüştür. Fakat Chit yüzeyde ince bir film oluşturmuş ve malzeme yüzeye iyi bir şekilde kaplanmıştır. Bu nedenle aynı koşullar altında üretilen elektrotlar ve yapılan deneyler sonucunda Chit damlatılan elektrotlarda hata payı oldukça düşük çıkmıştır. Bunun sonucu olarak deneylerin doğruluğunun artmasının yanı sıra kararlılığına olumlu etki edileceği düşünülmüştür. Bu nedenle kararlılığı inceleyebilmek için SPE/CTT/GO_x, SPE/CTT/GO_x/Chit, SPE/CPW/GO_x ve SPE/CTT/GO_x/Chit elektrotları 0,1 M PBS tamponu içerisinde 4 °C’de tutulmuştur ve farklı zamanlarda CA tekniğiyle akım cevapları incelenmiştir. Şekil 4.11’de elde edilen akım cevapları incelenip Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’te detaylı olarak yüzdesel olarak değişim analizi yapılmıştır.

Tablo 4.3. SPE/CPW/GO_x ve SPE/CPW/GO_x/Chit elektrotların 0,1 M PBS tamponunda 4 °C’de saklanırken farklı günler arasındaki akım cevaplarının yüzdesel olarak akım değişimi.

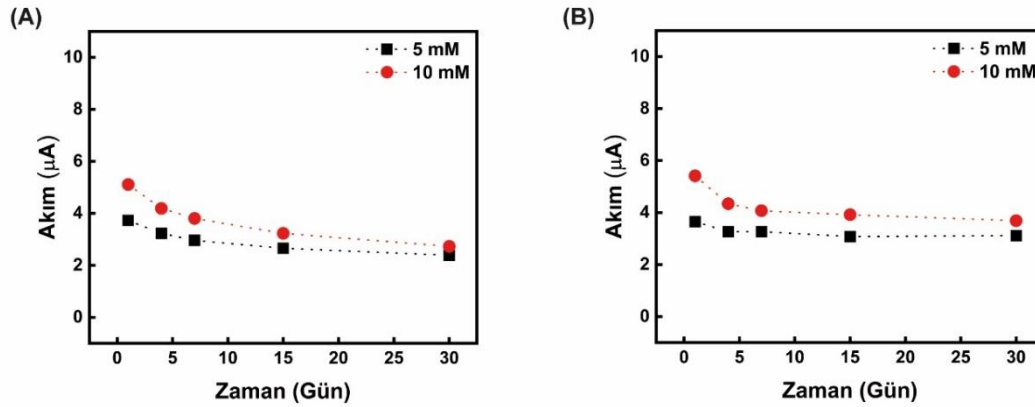
Glikoz Konsantrasyonu (mM)	Yüzelik Değişim			
	<i>SPE/CPW/GO_x</i>		<i>SPE/CPW/GO_x/Chit</i>	
	1&4 Gün	4&7 Gün	1&4 Gün	4&7 Gün
0	- %2	- %31	- %0	- %11
5	- %24	- %3	- %12	- %0
10	- %32	- %23	- %25	- %7

Tablo 4.4. SPE/CTT/GO_x ve SPE/CTT/GO_x/Chit elektrotların 0,1 M PBS tamponunda 4 °C’de saklanırken farklı günler arasındaki akım cevaplarının yüzdesel olarak akım değişimi.

Glikoz Konsantrasyonu (mM)	Yüzelik Değişim			
	<i>SPE/CTT/GO_x</i>		<i>SPE/CTT/GO_x/Chit</i>	
	1&4 Gün	4&7 Gün	1&4 Gün	4&7 Gün
0	- %12	- %4	- %10	- %6
5	- %7	- %22	- %15	- %9
10	%1	- %32	- %22	- %10

Analiz sonuçlarına göre Chit’in kararlılığa anlamlı bir şekilde etki ettiği görülmüştür. Ayrıca, Chit ile modifiye edilmeyen elektrotlarda bir hafta içerisinde SPE/CPW/GO_x elektrotunda akım cevapları cinsinden %55’lik büyük bir değişim, SPE/CTT/GO_x elektrotunda ise %31’lik bir değişim yaşanmıştır. Fakat, SPE/CPW/GO_x/Chit ile modifiye edilmiş elektrotta akım cevapları %33, SPE/CTT/GO_x/Chit elektrotunda ise %32 oranında bir değişim elde edilmiştir. Sonuçlar, elektrotların yüzeyinin ince bir filmle kaplanmasından dolayı enzim sızıntısına minimum seviyede izin verdiğini göstermektedir. Ayrıca, bu çalışma tek kullanımlık uygulama için test edilse de bu kararlılığın uzun süre kullanım için uygun olabileceği görülmektedir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde SPE/CTT/GOx/Chit ve SPE/CPW/GOx/Chit elektrotlar 4 °C’de kuru olarak saklanırken farklı günlerde (1, 4, 7, 15 ve 30 gün) 5 mM ve 10 mM glikoz konsantrasyonlarına verdiği cevaplar CA tekniğiyle izlenmiştir. Şekil 4.12’de görüldüğü üzere 30 günün sonunda SPE/CTT/GOx/Chit elektrotun 5 mM glikoz konsantrasyonuna verilen akım cevabı %56, 10 mM glikoz konsantrasyonuna verilen akım cevabı %87 değişmiştir. Yine 30 günün sonunda SPE/CPW/GOx/Chit elektrotun ise 5 mM glikoz konsantrasyonuna verilen akım cevabı %17, 10 mM glikoz konsantrasyonuna verilen akım cevabı %47 değişmiştir. Dolayısıyla, gerçekleştirilen bu modifikasyonda SPE/CTT/GOx ve SPE/CPW/GOx üzerine Chit damlatılarak yapılacak olan biyoelektronik uygulamanın stabilitesi ve kararlılığı arttırılmıştır.



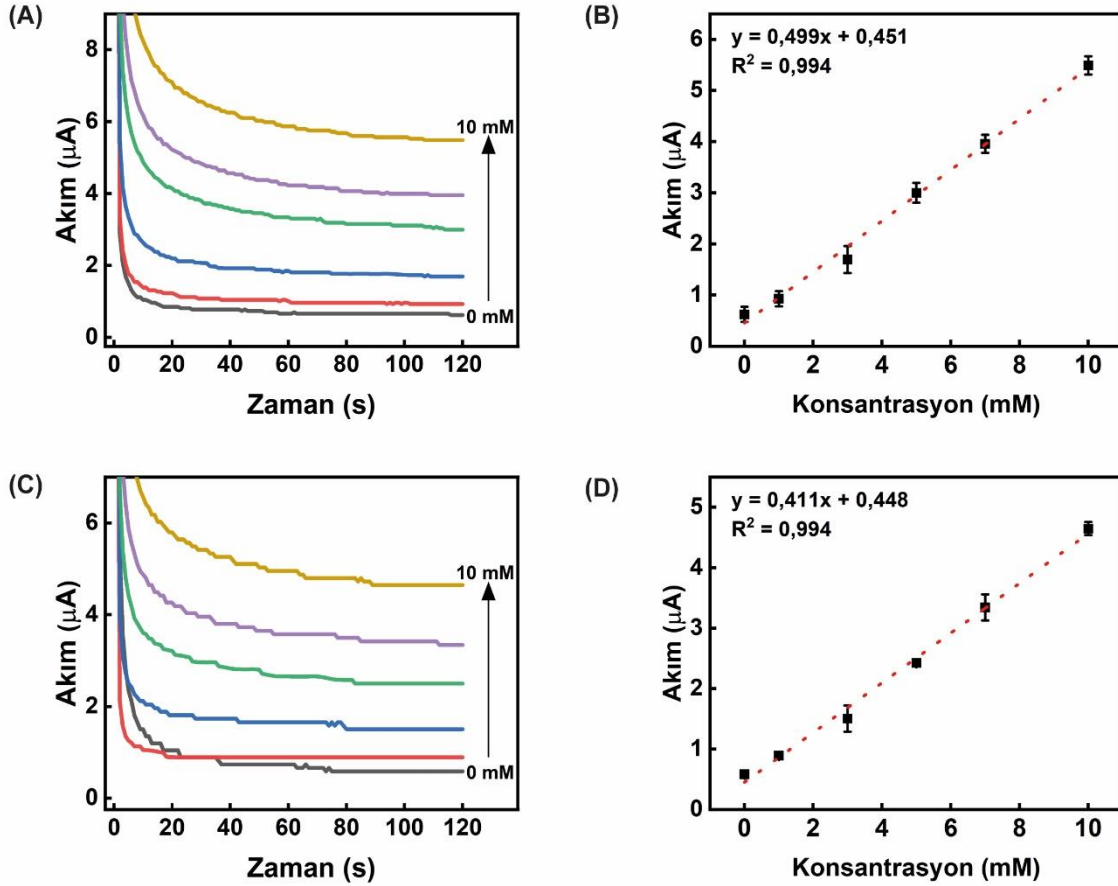
Şekil 4.12. (A) SPE/CTT/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW/GOx/Chit elektrotlarının raf ömrü. 5 mM ve 10 mM glikoza verilen yanıtlar, elektrotlar 4 °C’de kuru olarak saklanırken farklı günlerde (1, 4, 7, 15 ve 30 gün) izlenmiştir.

4.3.3. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit Elektrotların Modifikasyonu

Tez çalışması kapsamında Bölüm 4.3.1 ve 4.3.2’deki elektrokimyasal sonuçlar analiz edilmiştir. Bu bölümde ise çözelti içerisinde bir mediyatör kullanmak yerine, bu mediyatörün elektrot üzerine enzim ile uygulanmasının biyoelektronik uygulamanın performansı ve kullanılabilirliği açısından daha uygun olduğu değerlendirilmiştir. Bu kapsamda CTT veya CPW, 50 mM Fc’den oluşan bir süspansiyon hazırlanmış ve SPE’lere kaplanmıştır. Ardından SPE/CTT-Fc ve SPE/CPW-Fc elektrotlarına GOx enzimi 1 mg/mL konsantrasyonunda 1 µL damlatılmıştır.

Şekil 4.13 (A) ve Şekil 4.13 (C)’de hazırlanan sensörlerin PBS tampon çözeltisi içerisinde CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) tekniğiyle glikoz konsantrasyonlarına verdiği cevaplar

incelenmiştir. Her iki grafiğe de bakıldığında akım değişimi glikoz konsantrasyonuna göre doğrusal şekilde artmıştır. Şekil 4.13 (B) ve Şekil 4.13 (D)'de ise alınan amperometrik sonuçlarda glikozun artan varlığında elektrotun göstermiş olduğu akım değerleri ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve doğrusal denklem ile verilmiştir. CTT ve CPW ile modifiye edilmiş elektrotların çok yüksek korelasyon değerlerine sahip olduğu görülmektedir ve determinasyon katsayıları her iki malzeme için de 0,994 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.13. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotun (A) CA, (B) kalibrasyon eğrileri ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotun (C) CA, (D) kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) analizleri 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 50 mM'dır.

Şekil 4.13'te elde edilen sonuçlar incelendiğinde modifiye edilmiş elektrotlarda çözelti içerisinde bir mediyatör kullanmak yerine enzimle beraber elektrot yüzeyine uygulamak performansı arttırmıştır. Özellikle CTT malzemesi ile geliştirilen sensörün duyarlılığı artmış ve düşük konsantrasyonların tespiti için daha hassas bir ölçüm yapabilmeye imkân sağlamıştır. CPW'ye göre duyarlılığının daha iyi olmasının sebebinin malzeme kayıplarının en aza indirgenmesi olarak görülmektedir.

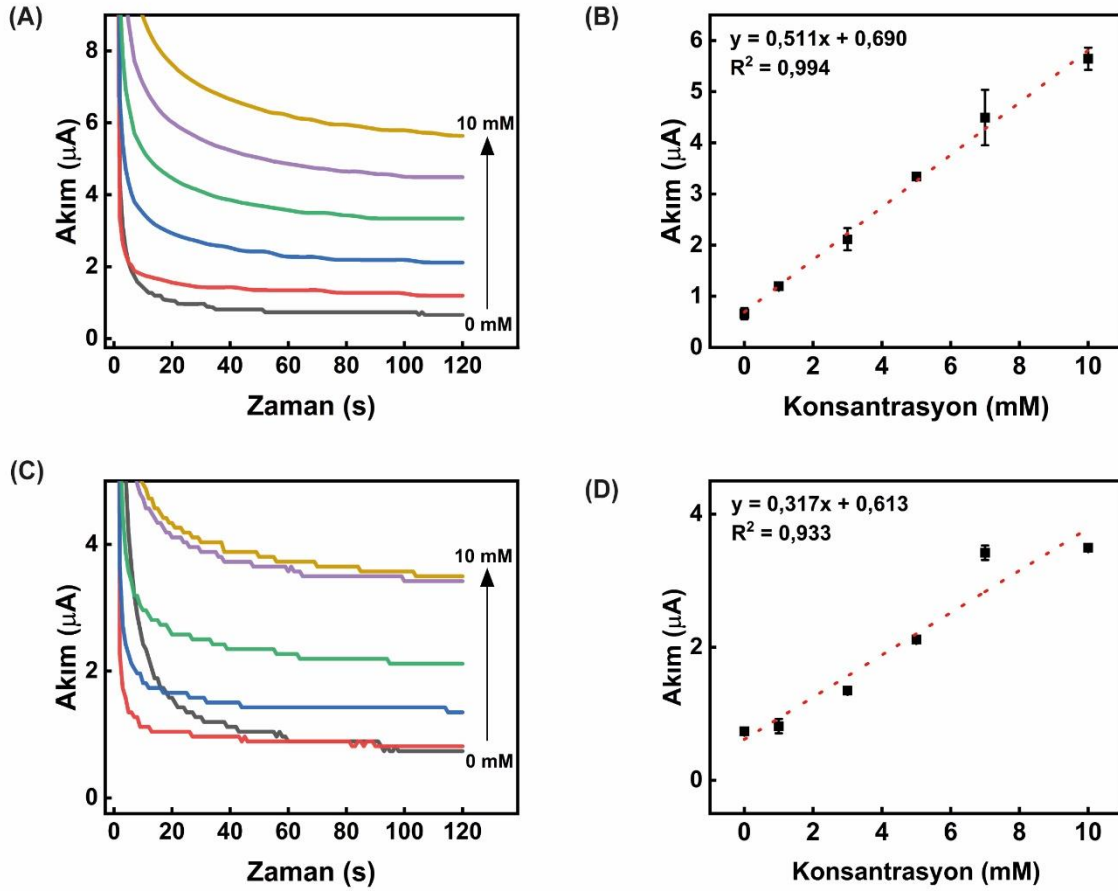
Şekil 4.13 (B) ve (D)'de kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemler incelendiğinde 0-10 mM glikoz konsantrasyonu arasında SPE/CTT-Fc/GOx/Chit'de akım 9,52 kat, SPE/CPW-Fc/GOx/Chit'de ise 6,96 kat artmıştır. Elektrot üretme aşamasında, modifikasyonla ilgili en büyük problemin aynı miktarda karbon malzeme ve Fc yüzeye hapsedilemeyeceği olarak öngörülmüştür. Bununla birlikte, yapılan tekrarlar sonucunda Şekil 4.13'te de görüldüğü üzere hata oranları oldukça düşük çıkmıştır. Sonuçlar incelendiğinde mediyatörü elektrot yüzeyine hapsedmenin çalışma aralığını ve hassasiyeti arttırdığı görülmektedir. Ayrıca, Chit'den dolayı olası bir difüzyon problemini de ortadan kaldırmıştır.

4.3.4. SPE/CTT/Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW/Fc/GOx/Chit Elektrotların Modifikasyonu

Gerçekleştirilen işlemlerin bu basamağında Bölüm 4.3.3'ten farklı olarak CTT ve CPW malzemeleri yüzeye kaplanmış ve mediyatör bir sonraki adımda elektrot üzerine uygulanmıştır. SPE yüzeyine her iki malzeme içinde malzeme yoğunluğu 1 mg/cm^2 ve Fc yüzeye malzeme yoğunluğu 1 mg/cm^2 olacak şekilde kaplanmıştır. Kullanılan Fc miktarı önceki bölümlerde olduğu gibi 50 mM'dır. Enzim tutuklama işlemi ise Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilerek GOx enzimi (1 mg/mL) çalışma elektrotu üzerine 1 μL hacimde damlatılmıştır.

Hazırlanan Şekil 4.14 (A) ve Şekil 4.14 (C)'de SPE/CTT/Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW/Fc/GOx/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların glikoz varlığında ve yokluğundaki aktivitesi elektrokimyasal olarak CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) tekniği ile incelenmiştir. Her iki grafiğe de bakıldığında glikoz konsantrasyonuna göre akım doğrusal şekilde artmıştır.

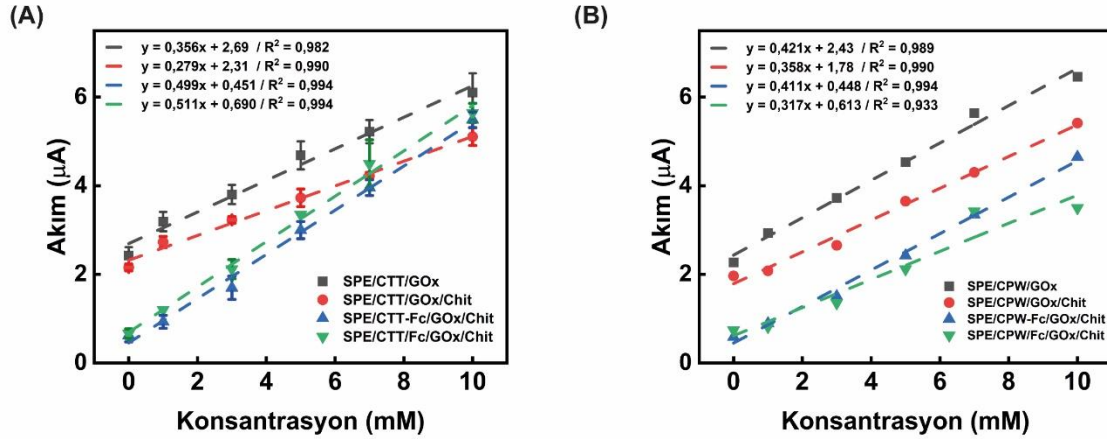
Kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemler incelendiğinde 0-10 mM glikoz konsantrasyonu arasında SPE/CTT/Fc/GOx/Chit'de akım 7,54 kat, SPE/CPW/Fc/GOx/Chit'de ise 3,74 kat artmıştır (Şekil 4.14 (B) ve (D)). Modifikasyonla ilgili yaşanan en büyük problem, elektrotun sınırlı yüzey alanından dolayı kaplamanın fiziksel zorluklarıdır ve Fc yüzeye kaplanırken taşmalar yaşanmıştır. Bu nedenle deneylerin tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği azalmıştır. Fakat net şekilde elde edilen sonuç, mediyatörün yüzeye hapsedilmesinin hassasiyeti ve performansı arttırdığıdır.



Şekil 4.14. SPE/CTT/Fc/GOx/Chit elektrotun (A) CA, (B) kalibrasyon eğrileri ve SPE/CPW/Fc/GOx/Chit elektrotun (C) CA, (D) kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) analizleri 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 50 mM'dır.

4.4. Modifiye Edilen Elektrotların Optimizasyon Çalışmaları

Şekil 4.15'te CTT ve CPW için 4 farklı modifikasyon yöntemi karşılaştırılmış ve hazırlanan enzimatik elektrotların sonuçları incelenerek uygun modifikasyon yöntemi belirlenmiştir. CTT ve CPW için geliştirilen elektrot modifikasyon yöntemlerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Her iki malzeme içinde Bölüm 4.3.3'te anlatılan modifikasyon yöntemi uygulandığında sensörlerin hassasiyeti ve stabilitesi artmıştır. Aynı zamanda tekrarlanan deney sonuçlarında da hata payı oldukça azalmıştır ve çok yüksek korelasyon katsayıları deneyin doğruluğunun başka bir ispatıdır. Bölüm 4.3.4'te anlatılan modifikasyon yöntemi uygulandığında SPE/CTT/Fc/GOx/Chit ile hazırlanan enzimatik elektrotun hassasiyeti Bölüm 4.3.3'te anlatılan yöntemle göre yüksek olduğu görülmektedir. Fakat hazırlanan elektrotlarda karşılaşılan kaplamanın fiziksel zorlukları ve tekrarlanan deneylerde hata payının yüksek olmasından dolayı bu yöntem seçilmemiştir.

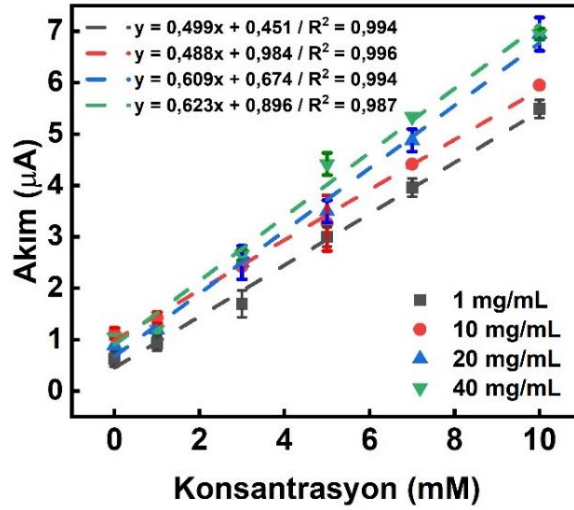


Şekil 4.15. (A) SPE/CTT ve (B) SPE/CPW ile hazırlanan dört farklı enzimatik elektrotun CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) sonuçlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır.

Analiz sonuçları incelendiğinde malzeme-Fc çözeltisinin yüzeye başarıyla kaplandığı ve performansı arttırdığı görülmüştür, aynı zamanda karbon malzemelerin benzer fiziksel ve kimyasal özellikte olduğunu sonucuna da ulaşılabilir. Bu kapsamda, Bölüm 4.3.3'te anlatılan modifikasyon yöntemi seçilerek optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle yapılacak olan optimizasyonlar için bir karbon malzeme seçilerek sonraki deneylerde kullanılmasının uygun olacağı değerlendirilmiştir. Optimizasyon sonuçlarını çok fazla etkilememesi için numuneler arasındaki standart sapmanın az olması karbon malzeme seçiminde belirleyici bir faktördür. Standart sapmanın numuneler arasındaki farkı en az olarak belirlenen malzeme CTT'dir. Bu nedenle, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilecek olan optimizasyon çalışmaları için CTT kullanılmıştır. Bu kapsamda Fc'nin, enzim miktarının ve CA analizi için uygulanacak olan potansiyelin optimize edilmesinin biyoelektronik uygulamaların performansını etkileyeceği öngörülmüştür.

4.4.1. Glikoz Oksidaz Enzimi Konsantrasyonu Optimizasyon Çalışmaları

Modifikasyon yöntemi belirlenen elektrotlar için enzim konsantrasyonu optimize edilerek daha iyi performans elde edilmesi hedeflenmiştir. GOx enzimi farklı konsantrasyonlarda kullanılarak sabit pH ve sıcaklık değerlerinde elektrokimyasal olarak test edilmiştir ve değişen glikoz miktarlarına göre kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Enzim tutuklama yöntemi Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.16. SPE/CTT-Fc elektrotunun üzerine tutuklanmış farklı enzim konsantrasyonları ile CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) sonuçlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri. Testler 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 50 mM'dır.

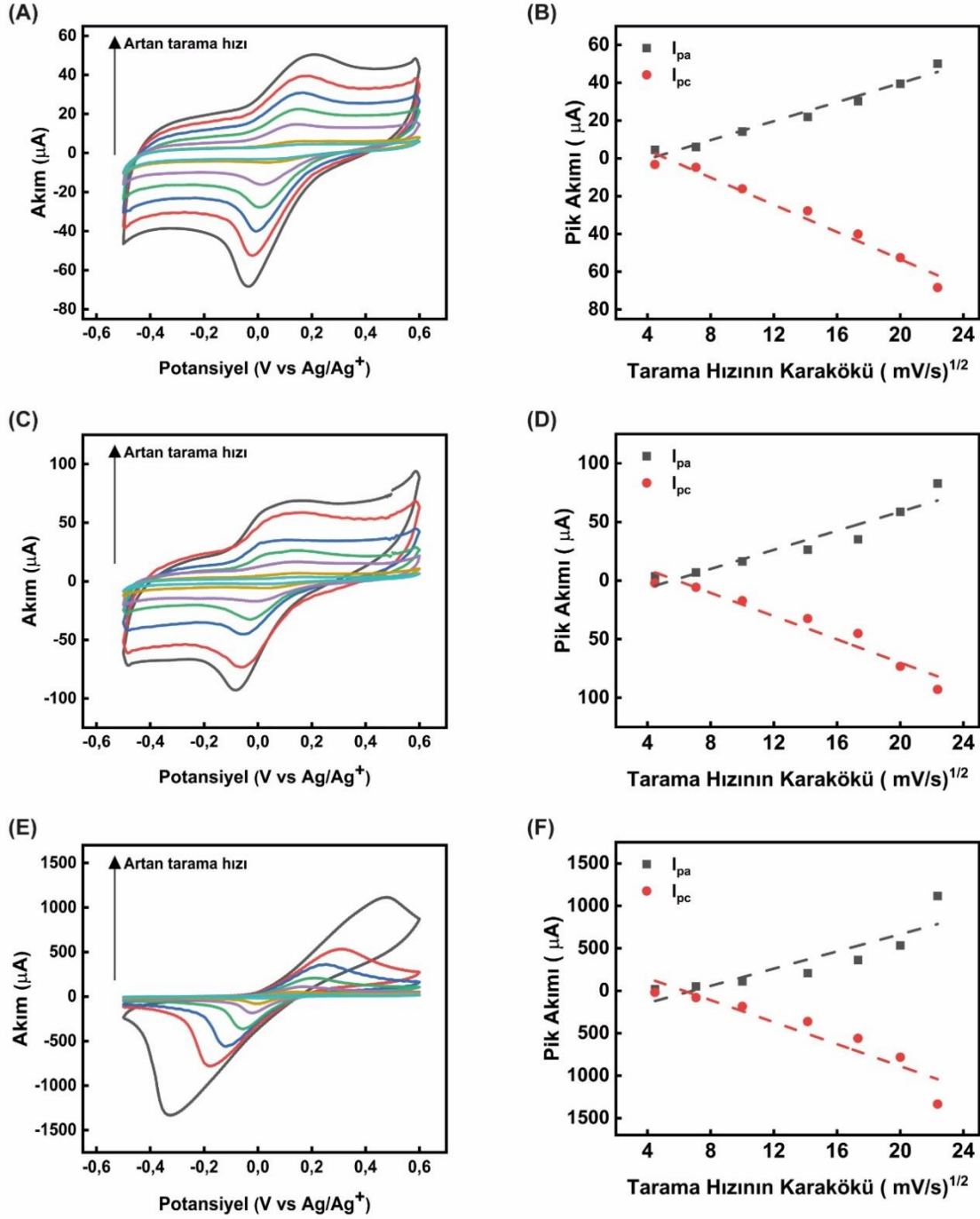
Şekil 4.16'da görüldüğü üzere enzim konsantrasyonu arttıkça (1 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL ve 40 mg/mL) enzim performansı substrat konsantrasyonundan bağımsız olarak artmıştır. CA sonuçlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri karşılaştırıldığında en yüksek enzim aktivitesine sahip enzim konsantrasyonları 40 mg/mL ve 20 mg/mL'dir ve sensörlerin duyarlılıkları %24 artmıştır. Bu iki konsantrasyonun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemlere bakıldığında hassasiyet değişimi %2,29'dur ve 0-10 mM glikoz konsantrasyonu arasında 20 mg/mL'de akım 7,80 kat, 40 mg/mL'de ise 6,65 kat artmıştır. Ayrıca enzim konsantrasyonu 20 mg/mL'den daha fazla kullanılsa bile, 10 mM glikoz konsantrasyonunda akımın 6,94 μA 'de sabitlendiği görülmüştür. Bu nedenle modifiye edilen elektrotlarda enzim konsantrasyonu optimum değeri 20 mg/mL olarak belirlenmiştir.

4.4.2. Ferrosen Miktarının Optimizasyon Çalışmaları

İlk olarak CV tekniği kullanılarak tarama hızı-pik akımı değişiminden faydalanılarak adsorpsiyon ve difüzyon gibi elektrot-çözelti ara yüzeyinde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar incelenmiştir.

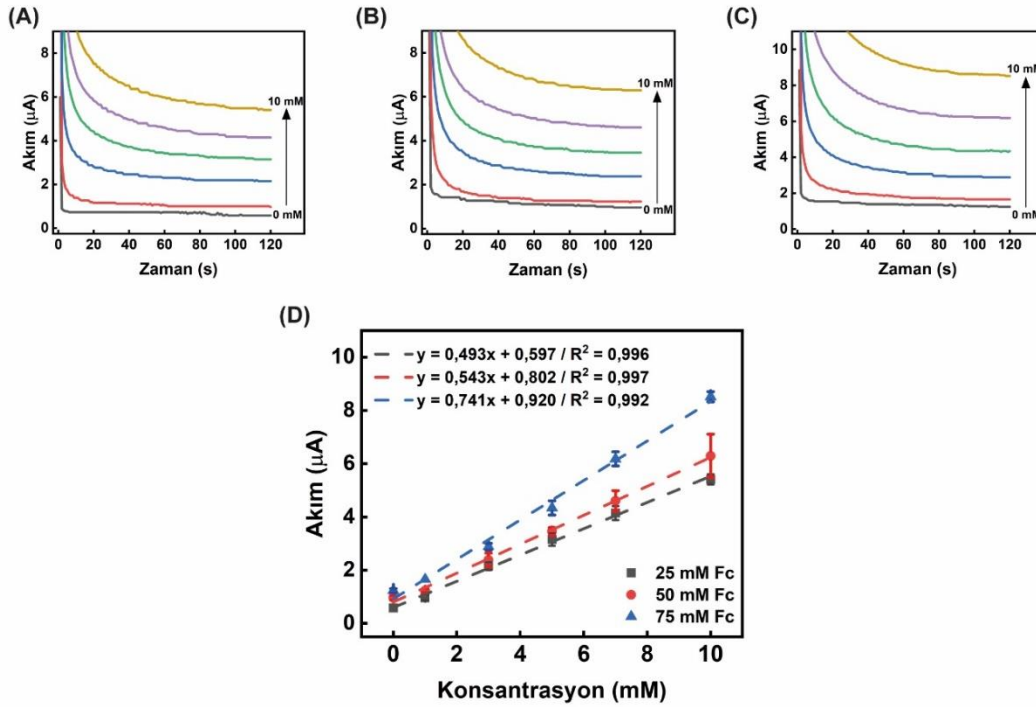
Bu amaçla Şekil 4.17 (A), (C) ve (D)'de görüldüğü üzere 0,1 M PBS içerisinde çeşitli tarama hızlarında CV tekniğiyle -0,5- 0,6 V (vs Ag/Ag^+) potansiyel aralığında elektrokimyasal performansı test edilmiştir. Şekil 4.17 (B), (D) ve (F)'de gösterildiği üzere yüksek tarama hızlarının kareköküyle pik akımlarının doğrusal olarak artması difüzyon kontrollü olduğunu

göstermektedir. Fc'nin bir difüzyon mediyatörü olduğunu düşünülürse; CTT ile modifiye edilmiş SPE ile Fc mediyatörünün arasındaki başarılı ve verimli elektron transfer mekanizmasının başarıyla elde edildiğini görülmektedir. SPE/CTT yüzeyine modifiye edilen Fc'nin miktarı arttıkça daha yüksek pik akımları gözlenmiş fakat artıdaki doğrusal cevabın artan Fc miktarıyla orantılı olarak azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.17. (A) SPE/CTT-25 mM Fc, (C) SPE/CTT-50 mM ve (E) SPE/CTT-75 mM elektrotları CV tekniği kullanılarak test edilmiştir. (B), (D) ve (F)'de ise farklı tarama hızları sonucunda elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının karekökü arasındaki ilişki incelenmiştir. CV'ler 0,1 M PBS içerisinde gerçekleştirildi.

Elektrokimyasal aktivitelerden sonra çözeltide kullanılacak olan Fc miktarını optimize etmek için 25 mM, 50 mM ve 75 mM Fc SPE'lere kaplanmıştır. Hazırlanan SPE/CTT-25 mM Fc/GOx/Chit, SPE/CTT-50 mM Fc/GOx/Chit ve SPE/CTT-75 mM Fc/GOx/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların değişen glikoz derişimine verdiği tepki CA ile incelenmiştir.



Şekil 4.18. CA ($V = 0,3$ (vs Ag/Ag^+)) tekniği kullanılarak (A) 'da SPE/CTT-25 mM Fc/GOx/Chit, (B) 'de SPE/CTT-50 mM Fc/GOx/Chit ve (C)'de SPE/CTT-75 mM Fc/GOx/Chit'in glikoz konsantrasyonlarının akım değişimi. (D) Fc miktarını belirleyebilmek için kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. Testler 0,1 M PBS içerisinde eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir.

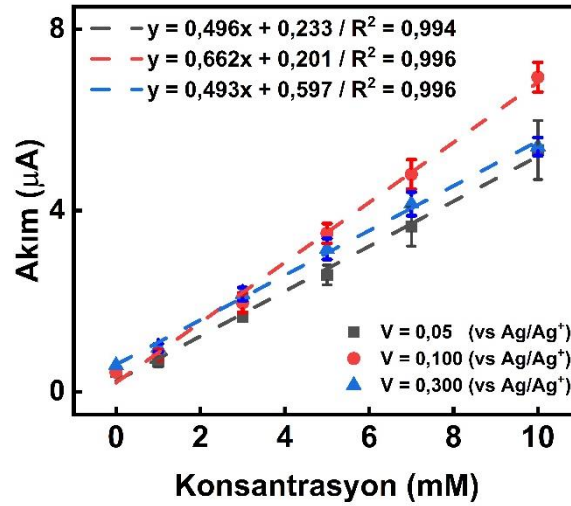
Şekil 4.18 (A)'da SPE/CTT-25 mM Fc/GOx/Chit'in, Şekil 4.18 (B)'de SPE/CTT-50 mM Fc/GOx/Chit ve Şekil 4.18 (C)'de SPE/CTT-75 mM Fc/GOx/Chit'in PBS tampon çözeltisi içerisinde CA tekniğiyle glikoz konsantrasyonlarına verdiği akım değişimi gösterilmiştir. Şekil 4.18 (D)'de ise alınan amperometrik sonuçlarda glikozun artan varlığında elektrotun göstermiş olduğu akım değerleri ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve doğrusal denklem ile verilmiştir.

Gerçekleştirilen elektrokimyasal karakterizasyon deneyleri ve elde edilen kalibrasyon eğrileri karşılaştırıldığında 25 mM ve 50 mM Fc ile modifiye edilen elektrotların akım cevaplarında büyük bir farklılık olmadığı görülmüştür. Aynı koşullarda hazırlanmış elektrotların standart sapma değerleri incelendiğinde ise malzeme-Fc çözeltisinde 25 mM Fc kullanılan elektrotların standart sapmasının daha düşük olduğu görülmüştür. Bu da üretim için farklı zamanda aynı koşullarda yeniden üretilecek elektrotlar için benzer elektrokimyasal performanslarının elde edilebileceğinin bir göstergesidir. Daha fazla Fc kullanılan elektrotlarda

daha yüksek hassasiyet elde edilmesine rağmen, doğrusallığın daha az olduğu ve Fc'nin difüzyon davranışının düşük miktarlardaki kaplamalara göre azaldığı görülmüştür. Bu nedenle mazleme-Fc çözeltisinde kullanılacak olan Fc miktarı 25 mM olarak belirlenmiştir.

4.4.3. CA Analizi İçin Uygulanacak Potansiyelin Optimizasyonu

Enzim ve mediyatör için optimum parametreleri belirlenen elektrotlar için CA tekniğinde kullanılacak potansiyel değeri optimize edilmiştir. Uygulanacak olan potansiyelin optimize edilmesinin en büyük sebebi yapılacak olan biyoelektronik uygulamanın maksimum verimle çalıştırılmak istenmesidir. Bu kapsamda Şekil 4.19'da SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotlarının PBS tampon çözeltisi içerisinde CA (0,05 V, 0,100 V ve 0,300 V) tekniğiyle glikoz konsantrasyonlarına verdiği akım cevapları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.19'da bulunan kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemler incelendiğinde en yüksek hassasiyet 0,100 V uygulandığında elde edilmiştir. Dolayısıyla yapılacak olan sensör uygulamalarında maksimum verim ve düşük hata payları elde edildiği için bu potansiyelin uygulanmasına karar verilmiştir.

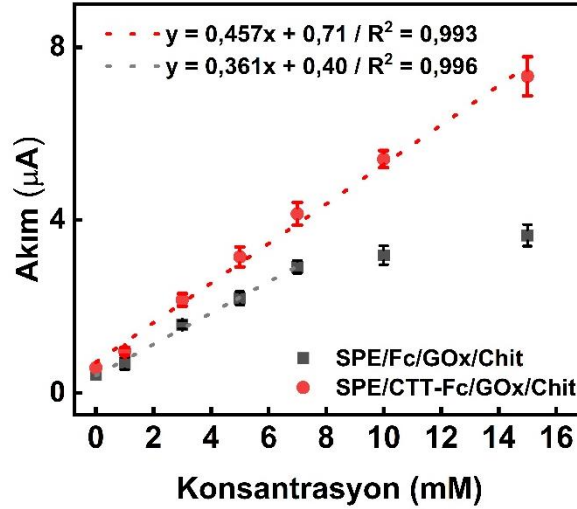


Şekil 4.19. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotuna farklı potansiyeller uygulanarak elde edilen kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. CA analizleri 0,1 M PBS içerisinde eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan Fc miktarı 25 mM'dır.

Daha sonra ise malzeme ile modifiye etmenin iletkenliği nasıl arttırdığını inceleyebilmek için Şekil 4.20'de görüldüğü üzere SPE/Fc/GOx/Chit ile SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotlarının PBS tampon çözeltisi içerisinde CA tekniğiyle 0-15 mM glikoz konsantrasyonlarına verdiği akım değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. SPE/Fc/GOx/Chit ile modifiye edilen elektrotun hassasiyeti ve ölçüm aralığı oldukça düşüktür. Grafik incelendiğinde 10 mM glikoz konsantrasyonuna kadar akım değerleri artmış fakat daha sonrasında enzim doyurucu glikoz konsantrasyonuna ulaşmış ve elde

edilebilecek en yüksek reaksiyon hızına ulaşılmıştır. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ile elde edilen kalibrasyon eğrisi incelendiğinde ise 15 mM glikoz konsantrasyonunda bile enzimin aktif bölgesi doyuma ulaşmamıştır ve hassasiyeti artmıştır. Dolayısıyla iletkenliğin ve ölçüm aralığının arttığı görülmektedir.

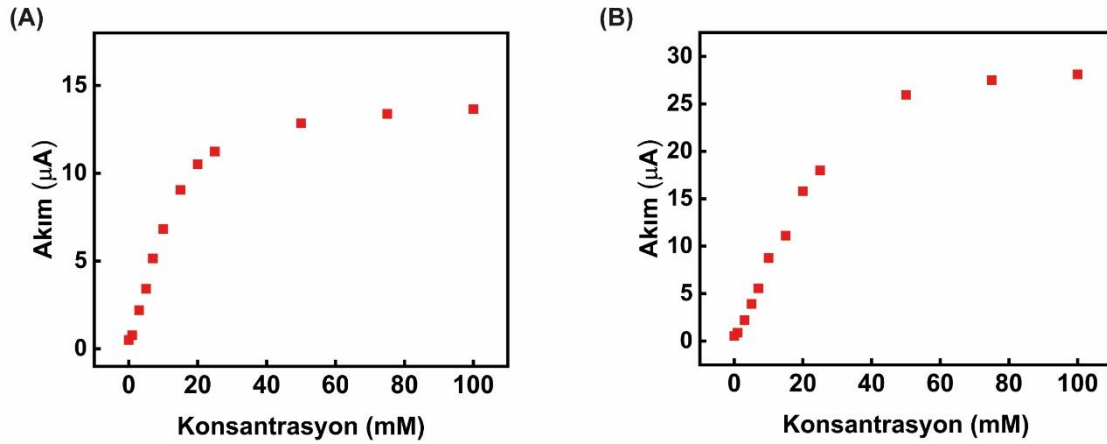


Şekil 4.20. SPE/Fc/GOx/Chit ve SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ile modifiye edilen elektrotların CA ($V = 0,1$ (vs Ag/Ag^+)) sonuçlarından elde edilen kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. Testler 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM'dır.

Son olarak modifiye edilen biyosensörün performans analizlerini gerçekleştirebilmek için doğrusal bir aralık seçilmiştir. Şekil 4.21 incelendiğinde her iki malzeme içinde, 0-15 mM glikoz konsantrasyonu arasında doğrusal olarak arttığı, 100 mM glikoz konsantrasyonundan sonra ise sabit kaldığı görülmüştür. 0-10 mM glikoz konsantrasyon aralığının doğrusal bölge olduğu belirlenmiştir ve orta değer seçilerek (5 mM) tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik testleri için bu değer kullanılmıştır.

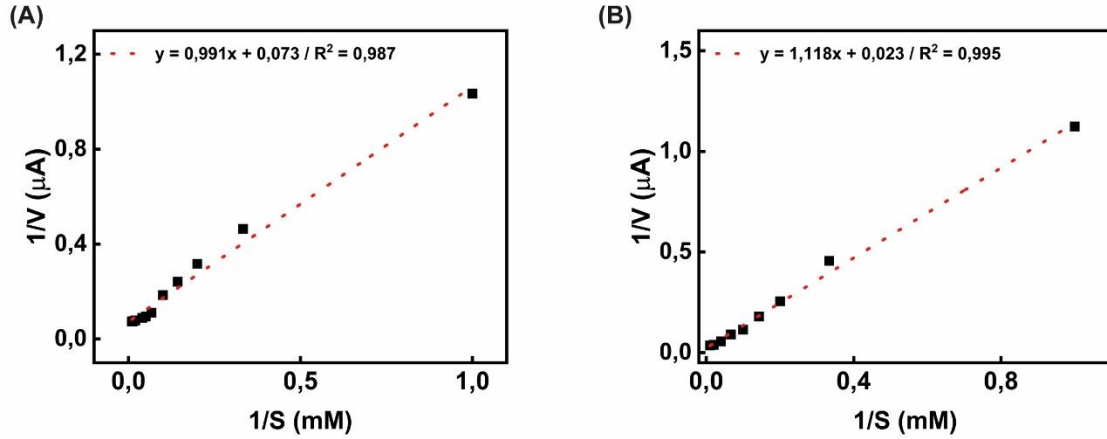
Enzimatik reaksiyonları anlayabilmek için substrat üzerinde bir enzimin performansı, Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızına (V_{max}) bağlıdır. Şekil 4.21'de gösterilen grafik incelendiğinde malzeme değişse de ilk reaksiyon hızının substrat miktarı ile doğru orantılı olduğu görülmektedir. Fakat yüksek glikoz konsantrasyonlarında enzimatik reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna göre sıfıncı derece olur, yani substrat miktarından bağımsız değişir. Çünkü enzimin aktif bölgesi substrata doymuştur ve artık artan substrat miktarının ürün oluşumuna bir etkisi kalmamıştır. Yani daha fazla enzim ekmeden daha hızlı bir reaksiyon elde edilemeyeceği için V_{max} 'a ulaşmıştır. K_m ise tepkimenin $V_{max}/2$ değerine ulaşmak için gerekli substrat miktarı yani afinitedir. Enzimatik reaksiyonları anlayabilmek için

substrat üzerinde bir enzimin performansı, Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızına (V_{max}) bağlıdır.



Şekil 4.21. (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotların akım değişimi ile elde edilen Michaelis-Menten grafiği. CA ($V = 0,1$ (vs Ag/Ag^+)) analizleri ile edilen akım değişimi 0,1 M PBS içerisinde eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM ve enzim konsantrasyonu 20 mg/mL'dir.

Şekil 4.21'de gösterilen grafik incelendiğinde malzeme değişse de ilk reaksiyon hızının substrat miktarı ile doğru orantılı olduğu görülmektedir. Fakat yüksek glikoz konsantrasyonlarında enzimatik reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna göre sıfırıncı derece olur, yani substrat miktarından bağımsız değişir. Çünkü enzimin aktif bölgesi substrata doymuştur ve artık artan substrat miktarının ürün oluşumuna bir etkisi kalmamıştır. Yani daha fazla enzim eklemeyen daha hızlı bir reaksiyon elde edilemeyeceği için V_{max} 'a ulaşmıştır. K_m ise tepkimenin $V_{max}/2$ değerine ulaşmak için gerekli substrat miktarı yani afinitedir. Optimizasyon sonuçlarına göre elde edilen Michaelis-Menten grafikleriyle enzim temelli elektrotların kinetik parametrelerini (K_m , V_{max}) ölçmek oldukça zordur. Bu nedenle hesaplamaların kolaylaşması için Şekil 4.22'de gösterilen Lineweaver ve Burk yöntemi kullanılarak K_m ve V_{max} hesaplanmıştır. Fakat bu eğrilerin V_{max} tahmini iyi olmasına rağmen K_m değerlerini okumak zordur. Çünkü düşük substrat konsantrasyonlarındaki değerler eğimi ve kesme noktasını etkilemektedir (Shuler vd, 2002). Şekil 4.22 (A)'da V_{max} değeri 13,7 µA ve Şekil 4.22 (B)'de V_{max} değeri 30,3 µA olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.21 (A)'dan elde edilen K_m değeri 13,58 mM ve Şekil 4.21 (B)'de K_m değeri 19,18 mM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen K_m değerleri, literatüre bakıldığında Nenkova vd. (13,9 mM), Zou vd. (14,4 mM), Jia vd. (20,3 mM) ve X. Chen vd. (21 mM) tarafından bildirilen K_m değerlerinden düşüktür (X. Chen vd, 2003; Jia vd, 2007; Nenkova vd, 2010; Zou vd, 2008).



Şekil 4.22. (A) SPE/CTT-Fc/GO_x/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GO_x/Chit enzimatik elektrotların Lineweaver ve Burk grafiği.

4.5. Modifiye Edilen Biyosensörün Performans Analizleri

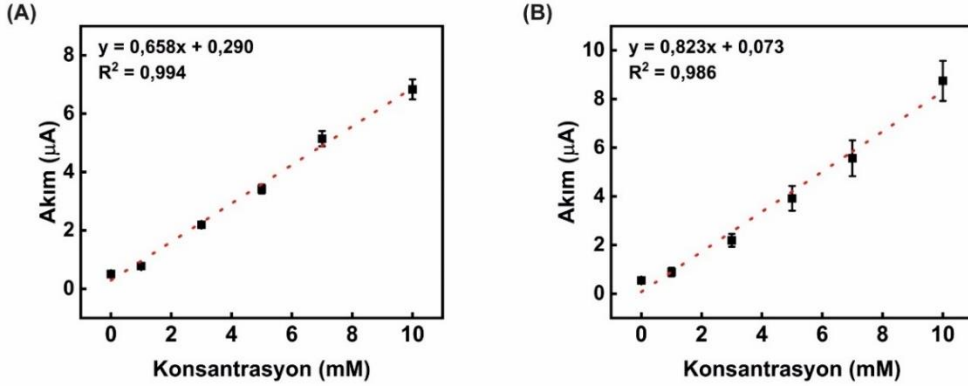
Bu bölümde, çalışma koşulları optimize edilen sensörlerin analitik performans deneyleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.23'te SPE/CTT-Fc/GO_x/Chit ve SPE/CPW-Fc/GO_x/Chit ile modifiye edilmiş elektrotların değişen glikoz derişimine verdiği tepki CA ($V = 0,1$ (vs Ag/Ag^+)) tekniği ile incelenmiştir. Şekil 4.23 (A) ve Şekil 4.23 (B)'te ise alınan amperometrik sonuçlarda glikozun artan varlığında elektrodun göstermiş olduğu akım değerleri ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve doğrusal denklem ile verilmiştir. Her iki grafiğe göre akım değişiminin glikoz derişimine göre doğrusal şekilde arttığı görülmüştür. CTT ve CPW ile modifiye edilmiş elektrotların 0-10 mM glikoz derişimindeki akım değişimi doğrusal bir denklemle verilmiştir ve çok yüksek korelasyon değerlerine sahip olduğu görülmektedir.

Geliştirilen biyosensörün seçiciliği tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri ile belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri aşağıda verilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır (Lister, 2005):

$$LOD = 3,3 \times (SD/m) \quad (\text{Denklem 4.1})$$

$$LOQ = 10 \times (SD/m) \quad (\text{Denklem 4.2})$$

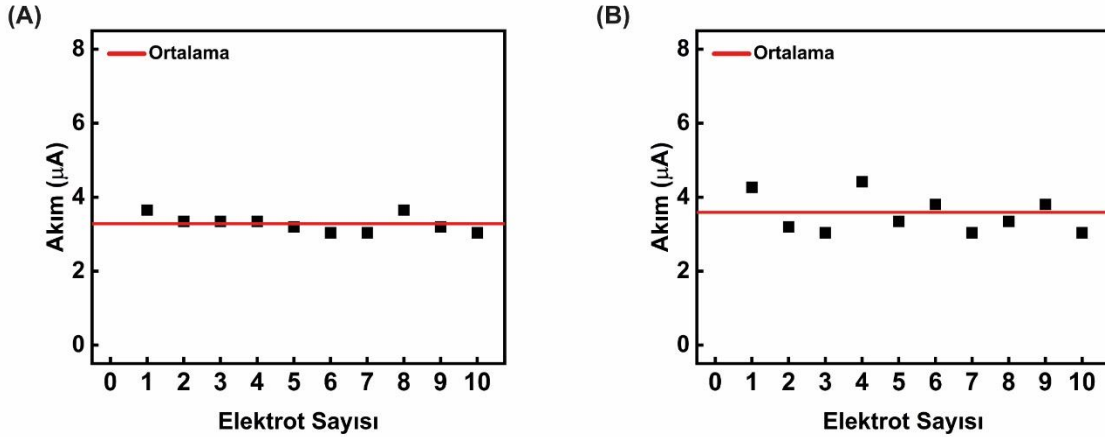
Denklem 4.1 ve 4.2'de kullanılan SD değeri boş çözeltinin standart sapmasını, m değeri ise kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğimi ifade etmektedir. Denklemler kullanılarak CTT ve CPW için LOD değerleri ise sırasıyla, 0,45 mM ve 0,31 mM ve LOQ değerleri ise sırasıyla 1,35 mM ve 0,93 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.23. (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotun ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit kalibrasyon eğrileri gösterilmiştir. CA ($V = 0,1$ (vs Ag/Ag^+)) analizleri 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM' dir.

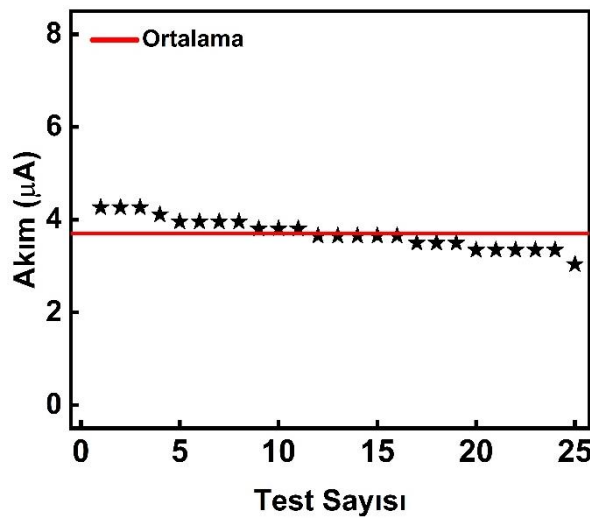
4.5.1. Tekrar Kullanılabilirliğinin ve Tekrar Üretilirliğinin İncelenmesi

Teşhis uygulamaları için biyosensörler düşünüldüğünde ortaya çıkan en basit soru, tek kullanımlık mı yoksa tekrar kullanılabilen biyosensörlerin tercih edileceğidir. Bu uygulamalarda herhangi bir ölçüm gerçekleştirmenin en önemli noktası, bir numune ile elde edilen sonucun bir önceki numune tarafından değiştirilmemesi için bulaşma etkilerinden kaçınılmasıdır (Rapp vd, 2010). Bu kapsamda, optimum şartlar altında hazırlanan SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotların tekrar üretilebilirliğini incelemek için on elektrota 5 mM glikoz konsantrasyonu kullanılarak $+0,100$ V (vs Ag/Ag^+) potansiyeli uygulanmıştır.



Şekil 4.24. (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotların tekrar üretilebilirliği.

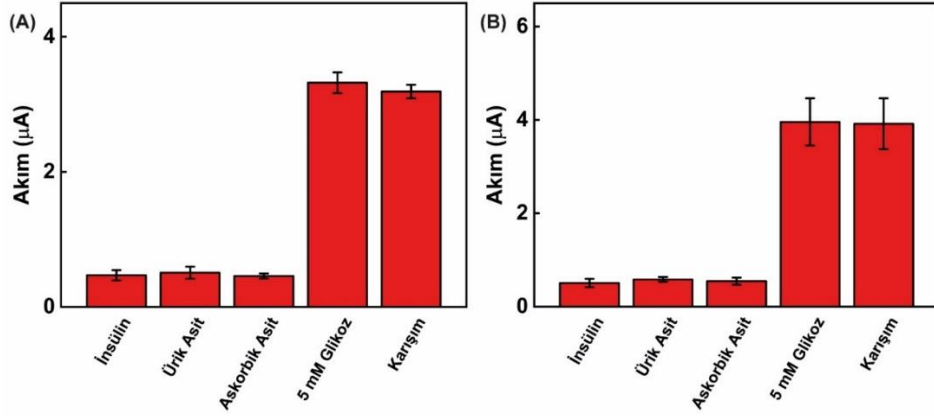
Şekil 4.24'te görüldüğü üzere elde edilen akım değerleri sonucunda hesaplanan RSD değeri SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotu için %6,67 ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit için ise %12,85'tir. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotun RSD değerinin daha düşük olduğu ve farklı elektrotlarla yapılan ölçümlerin ortalama değere yakın çıktığı görülmüştür. Geliştirilen biyosensör için tekrar üretilebilirliğin düşük RSD değerlerine sahip olması analizlerin daha doğru sonuç vermesi olarak değerlendirilir. Bu nedenle Şekil 4.25'te SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotu seçilerek geliştirilen biyosensörün tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir ve RSD değeri %8,93 olarak hesaplanmıştır. Yapılan 25. ölçümden sonra yüzeyde deformasyonlar olmuştur ve yapılan ölçümler gerçeği yansıtmamıştır.



Şekil 4.25. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotunun tekrar kullanılabilirliği

4.5.2. Girişim Etkisi

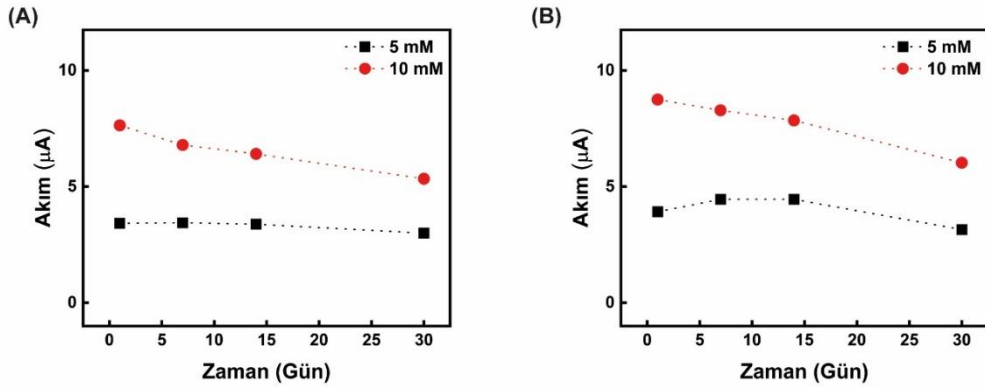
SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotları optimize edilen koşullarda hazırlanarak girişim etkileri incelenmiştir. Girişim çalışmalarını gerçekleştirmek için glikoz biyosensörleri üzerinde girişime neden olabilecek AA, UA ve Ins kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında hazırlanan SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotlarına sırasıyla çözeltiler eklenerek akım cevapları kaydedilmiştir ve girişim etkisi incelenmiştir. Son olarak bir karışım çözelti hazırlayıp glikoz için elde edilmesi gereken akım cevabının elde edildiği tespit edilmiştir ve Şekil 4.26'da görüldüğü üzere girişim için test edilen maddelerden elde edilen cevaplarda herhangi bir anlamlı değişim görülmemiş ve glikoz ile kıyaslandığında elde edilen sinyal farklılıkları standart sapma değerleri aralığında kalmıştır.



Şekil 4.26. Girişim yapan maddelerin (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit sensörlerinin üzerindeki etkisi

4.5.3. Raf Ömrü

Bu kısımda, SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotlar 30 gün boyunca gözlemlenerek ilk güne oranla akım değişimleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.27) 30 günün sonunda 5 mM glikoz konsantrasyonu için SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotundan elde edilen akım cevabı %12,33, 10 mM glikoz konsantrasyonu için elde edilen akım cevabı ise %30,12 değişmiştir. 5 mM glikoz konsantrasyonu için SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotundan elde edilen akım cevabı %19,56, 10 mM glikoz konsantrasyonu için elde edilen akım cevabı ise %31,11 değişmiştir.



Şekil 4.27. (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotlarının raf ömrü. 5 mM ve 10 mM glikoz konsantrasyonları için verilen yanıtlar, elektrotlar 4 °C'de kuru olarak saklanırken farklı günlerde (1, 7, 15 ve 30 gün) izlenmiştir. CA ($V = 0,1$ (vs Ag/Ag^+)) analizleri 0,1 M PBS içerisine eklenen glikoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM'dir.

Akımlarda yaşanan değişimin sebebinin zamanla elektrot yüzeyinde tutuklanmış GOx'ın yüzeyden sızmasından ya da zamanla enzimin denatüre olabileceğinden dolayı kaynaklanacağı düşünülmüştür. Bunun sonucunda raf ömrü uzun süreli deneyler için yüksek

glikoz konsantrasyonlarında kullanılmak için uygun olmamakla birlikte, gerçek kan numunelerinde glikoz konsantrasyonunu (4,4 – 6,1 mM) belirlemede kullanmak için oldukça yeterlidir.

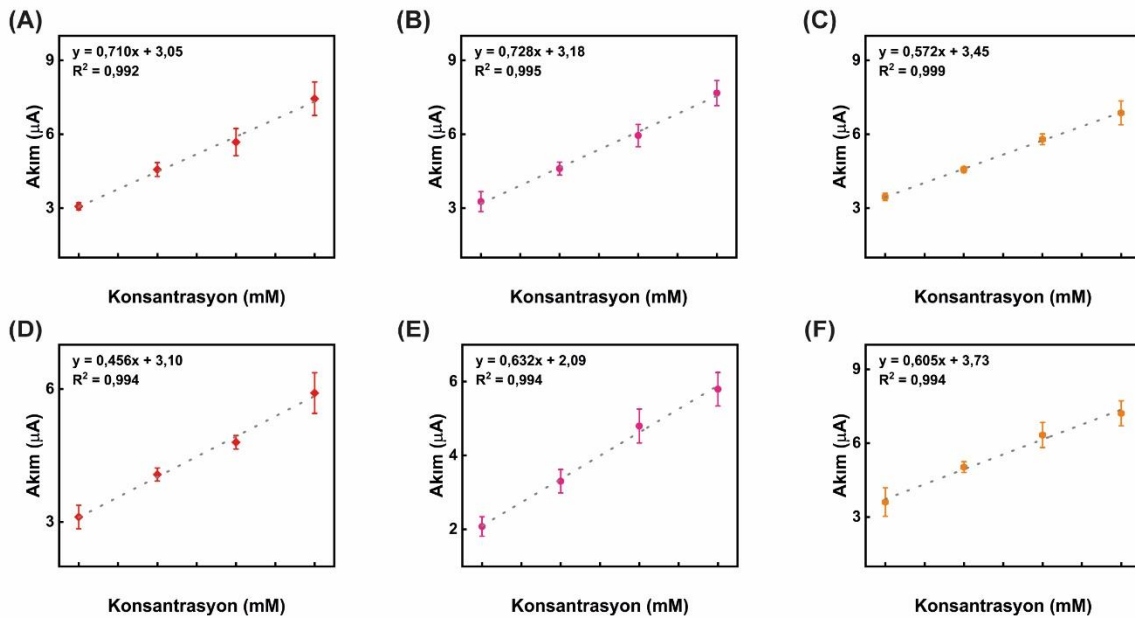
Geliştirilen elektrotların optimum çalışma koşulları ve performans analizleri Tablo 4.6’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotunun yüksek korelasyon değeri, düşük standart sapma ve tekrar üretilebilirlik sağladığı görülmüştür. Bu nedenle gerçekleştirilecek olan gerçek numune uygulamasında test edilmesi için SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotun kullanılmasının verilerin doğru analizi açısından daha uygun olduğu düşünülmüştür.

Tablo 4.6. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotlarının optimum çalışma koşulları ve performans analizleri

Analitik Parametreler	Sayısal Değerler	
	<i>SPE/CTT-Fc/GOx/Chit</i>	<i>SPE/CPW-Fc/GOx/Chit</i>
Karbonize Malzeme Miktarı	1 mg/cm ²	1 mg/cm ²
Fc Miktarı	25 mM	25 mM
Enzim Miktarı	20 mg/mL	20 mg/mL
Doğrusal aralık	0-10 mM	0-10 mM
Çalışma Potansiyeli	0,100 V (vs Ag/Ag ⁺)	0,100 V (vs Ag/Ag ⁺)
Doğrusal denklem	$y = 0,658x + 0,290$	$y = 0,823x + 0,073$
Eğimin hatası ±	0,02445	0,04907
Kesim noktasının hatası ±	0,13542	0,27172
R ²	0,994	0,986
Tekrar Üretilebilirlik	%6,67	%12,85
LOD ve LOQ	0,45 mM / 1,35 mM	0,31 mM ve 0,93 mM

4.6. Gerçek Numune Uygulaması

Şeker tayini için Lane-Eynon, Luff-Schoorl ve yüksek sıvı kromatografisi (HPLC) gibi farklı yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Meyvelerdeki şekerler genel olarak heksozlardan (glukoz ve fruktoz) oluşmaktadır ve bu şekerlere indirgen şeker denilmektedir. Tayin yöntemlerinin temel prensibi, şekerlerin indirgen özelliğine dayanmaktadır. Enstrümantal kimyasal analizde standart bir ekleme yönteminin ilk kullanımı, 1937'de Hohn tarafından polarografide kullanılmıştır. 1941 yılında ise Lingane ve Kerlinger tarafından standart ekleme terimi İngilizce'de ilk kez kullanılmıştır (Burns ve Walker, 2019). Standart ekleme, bilinmeyen bilinen miktarlarda analiz edilen numune eklenir (Harris, 2011). Bu yöntem, analit konsantrasyonunun büyük olduğu durumlarda biyosensörün yüksek konsantrasyonlarda pratik kullanımı zor olduğu için tercih edilir (Brown ve Mustoe, 2014).



Şekil 4.28. Ekstra geleneksel (A) vişne, (B) çilek, (C) kayısı reçelleri ve diyabetik (D) vişne, (E) çilek, (F) kayısı reçellerine ait standart ekleme eğrileri.

Bu tez çalışmasında, günün her saatinde tüketilebilen reçellerin içerisindeki şeker miktarı tayini için modifikasyonu gerçekleştirilen biyosensörlerin uygulanabilirliği gerçek numuneler üzerinde değerlendirildi. Bu kapsamda, gerçek numune uygulaması ticari olarak satılan KOSKA markasının ekstra geleneksel ve diyabetik reçelleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, standart ekleme yöntemi kullanılarak Şekil 4.28'deki eğriler çizilmiştir ve elde edilen grafikler kullanılarak glukoz ölçümleri yapılmıştır. Bölüm 3.2.5.3'te anlatıldığı gibi hazırlanan numuneler belirli miktarlarda alınıp geliştirilen biyosensör üzerine

damlatılarak kalibrasyon eğrisi kullanılarak numune konsantrasyonları bulunmuştur (Tablo 4.6).

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre ekstra geleneksel reçel; şekerler ve meyvelerin belirli bir kıvama getirilmiş halidir. Geleneksel reçelden farkı içeriğindeki meyve oranının en az %45 olmasıdır (Anonim, 2006). Yapılan bir çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılarak ticari olarak satılan vişne, çilek ve kayısı reçellerinin şeker analizi yapılmıştır. Reçellerin içeriğinde glikoz, meyve şekeri (früktoz) ve sakkaroz bulunmaktadır. Sonuçlar incelendiğinde meyve oranı en az %45 olan reçelerde ortalama %55 glikoz bulunmaktadır (Cemal vd, 2012). Reçellerin ham maddesi meyve ve şekerdir. Son zamanlarda meyvenin kendi tadından (früktoz) yararlanılarak şekerless reçeller yapılmaktadır. Diyabetik ürünlerde ise şeker oranı yaklaşık %20-25 oranında daha azdır.

Tablo 4.7. Standart ekleme ve kalibrasyon yöntemleriyle belirlenen glikoz konsantrasyonu (n=4).

Reçel Türü	KOSKA ^a (mM)	Kalibrasyon (mM)	S.E ^b (mM)	Geri Kazanım*	%RSD
Vişne Reçeli	4,51	4,22 ± 0,223	4,30 ± 0,147	96,20	4,57
Çilek Reçeli	4,46	4,51 ± 0,615	4,38 ± 0,405	88,91	11,78
Kayısı Reçeli	4,53	4,80 ± 0,222	6,02 ± 0,146	84,79	4,01
D. Vişne Reçeli	4,4	4,28 ± 0,402	4,36 ± 0,265	102,80	8,14
D. Çilek Reçeli	3,11	2,71 ± 0,397	3,31 ± 0,261	114,76	12,67
D. Kayısı Reçeli	4,58	5,04 ± 0,878	6,15 ± 0,578	90,87	15,09

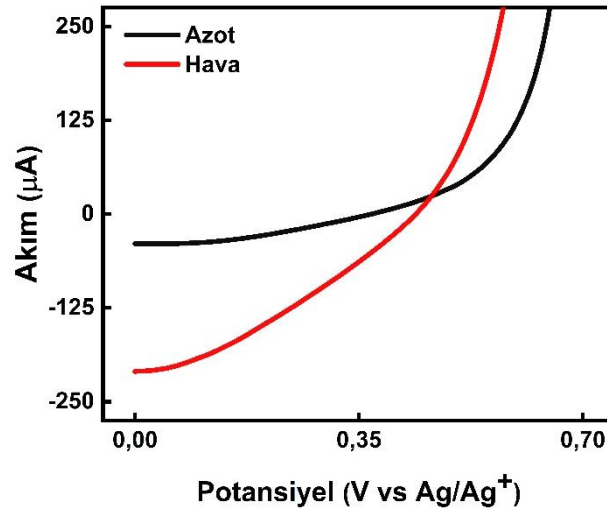
^a Koska firmasının glikoz konsantrasyonu literatür (Cemal vd, 2012) değerlerine göre tahmini olarak hesaplanmıştır, ^b Standart ekleme yöntemi, *Geri kazanım değerleri biyosensör kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır.

Standart ekleme ve kalibrasyon yöntemiyle indirgen şeker analizi yapılan reçelerde glikoz oranı %55, meyve şekeri (früktoz) oranı ise %45 alınmıştır. Tablo 4.7'deki sonuçlar incelendiğinde vişne ve çilek reçelinde üretici firmanın rapor ettiği etiket değerleriyle SPE/CTT-Fc/GOx/Chit sensörüyle yapılan glikoz ölçümleri oldukça yakındır.

4.7. Katot Geliştirilmesi ve Enzimatik Yakıt Hücresi Karakterizasyonu

Katot Geliştirilmesi

Bir yakıt hücresinde katalizörler katotta oksijenin indirgenmesi ve anotta yakıtın oksidasyonu ile güç üretmek için oldukça önemlidir çünkü bu katalizörler elektrokimyasal reaksiyonları kolaylaştırmaktadır. Özellikle yüksek akım yoğunluklarında hücre performansını sınırlayabilen elektrotların polarizasyonuna katkıda bulunabilir (Dicks, 2006). Dolayısıyla, yakıt hücresinin oksijen indirgenme reaksiyonunun gerçekleştiği katot için elektrot modifikasyon yöntemi geliştirilmiştir.



Şekil 4.29. SPE/PtB'nin oksijen varlığındaki performansı incelenmiştir. Testler 0,1 M PBS ile LSV tekniği kullanılarak elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. PtB yükleme miktarı 5,6 µL ve malzeme yoğunluğu 1 mg/cm²'dir.

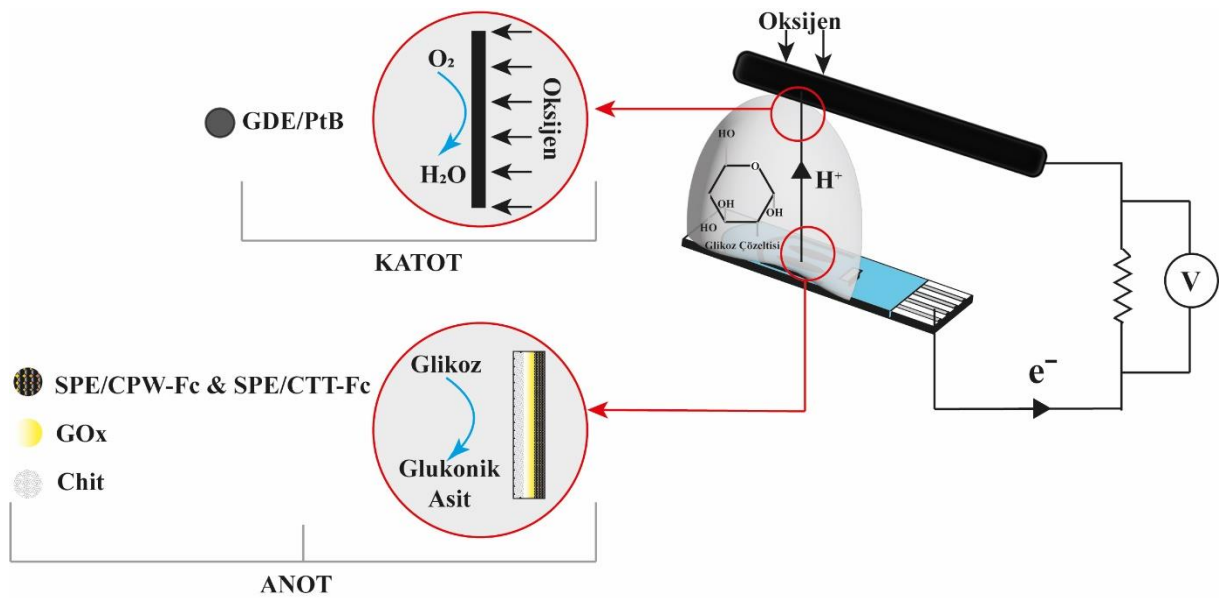
Şekil 4.29'da hazırlanan SPE/PtB oksijen varlığında ve yokluğundaki performansı 0,1 M PBS içerisinde incelenmiştir. Tampon çözelti ilk olarak azotla daha sonra havayla doyurulup 0,7 – 0 V (vs Ag/Ag⁺) aralığında 1 mV potansiyel adımı ve 20 mV/s tarama hızında LSV tekniği kullanılarak elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. PtB'in oksijen indirgenme reaksiyonuna etkisi Şekil 4.29'daki akım değerlerine bakıldığında görülmektedir. Elde edilen yaklaşık 5 kat akım artışı SPE/PtB'nin enzimatik yakıt hücresinde oksijen indirgenmesi reaksiyonu gerçekleştirerek katot olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Yakıt Hücresi Karakterizasyonu

İlk yapılan deneylerde hazırlanan enzimatik yakıt hücrelerinden bir güç değeri elde edilememiştir. Bunun nedeninin SPE'lerin düşük yüzey alanından dolayı katotta yakıt hücresi performansını kısıtlaması olduğu değerlendirilmiştir. Dolayısıyla, hazırlanan yakıt hücresinin

performansının katot performansını artırmak için PtB kaplanmış GDE kullanılmıştır. GDE kullanılarak ve birim alan başına maksimum malzeme yoğunluğu sağlanarak yakıt hücresi performansının artırılması amaçlanmıştır. Yakıt hücresinin katodu GDE/PtB olarak simgelenmiştir.

Yakıt hücresi karakterizasyonu için anodu SPE/CTT-Fc/Chit ve SPE/CPW-Fc/Chit olan katodu GDE/PtB olan enzimatik yakıt hücreleri için performans analizi yapılmıştır. PtB 0,15 cm² alana üzerine maksimum malzeme doluluğu sağlanacak şekilde kaplanmıştır. Enzimatik yakıt hücresinin karakterizasyonu için anot ve katot arasına farklı dirençler uygulanarak güç eğrileri elde edilmiştir. İlk olarak, yakıt hücresinin akım çalışma değerlerinin belirlenmesi ve 'power overshoot' (güç aşılması) ile performans düşüklüğü yaşamaması için 5 mM glikoz konsantrasyonuyla polarizasyon eğrisi elde edilmiştir.

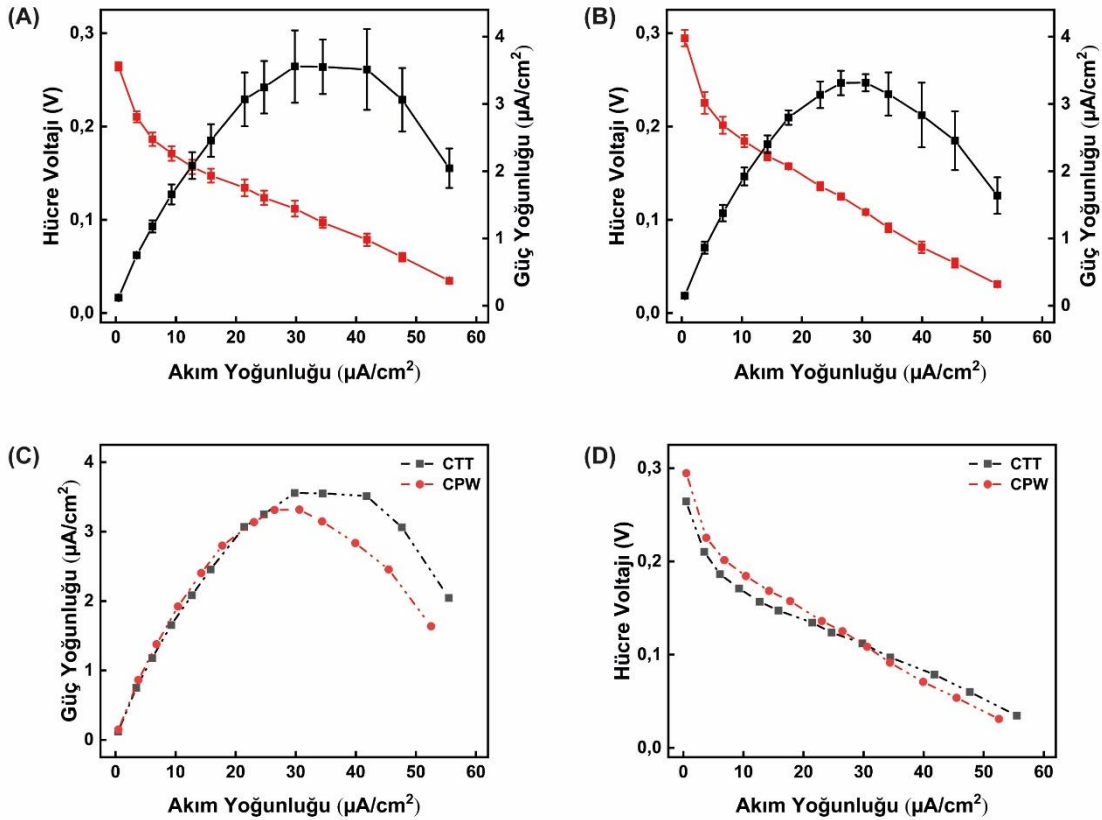


Şekil 4.30. Enzimatik yakıt hücresi karakterizasyonunun şematik gösterimi

Şekil 4.30 (A)'da SPE/CTT-Fc/GOx/Chit anodu katodu GDE/PtB olan ve Şekil 4.30 (B)'de SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu katodu GDE/PtB olan enzimatik yakıt hücrelerinin 5 mM glikoz konsantrasyonuyla elde edilen polarizasyon sonuçları gösterilmektedir. Şekil 4.31 (A)'da 2,46 μ A ve Şekil 4.31 (B)'de 2,35 μ A değerinden sonra yakıt hücresi güç yoğunluğu hızlı bir şekilde düşüşe geçmiştir, bu noktada güç aşımı etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sebep de düşük performans ve güç yoğunluğundaki görünümü açıklamakla birlikte sürekli çalışan bir sistem hazırlandığında maksimum güç yoğunluğunun belirlenmesini engelleyecektir. Enzimatik yakıt hücresinin performansını geliştirmek için güç

aşımı için çeşitli yaklaşımlar uygulanarak problemin üstesinden gelinir. Örneğin yakıt hücresinde güç aşımı problemini çözmek için akış destekli bir tasarım gerçekleştirerek uygulanan her dış dirençte tam uyum sağlanabilir (Amirdehi vd, 2022).

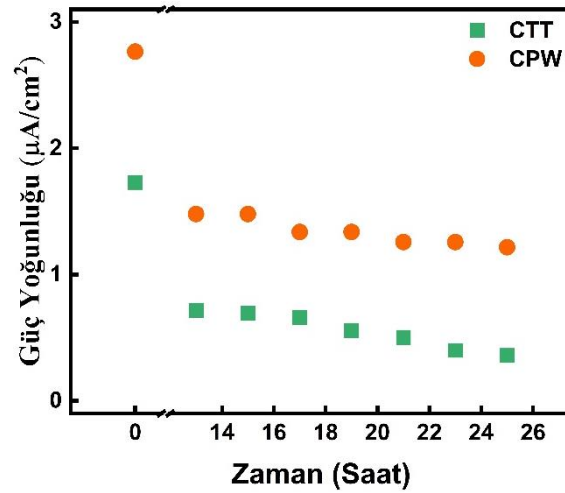
Şekil 4.31 (C) ve Şekil 4.31 (D) incelendiğinde, geliştirilen iki farklı yakıt hücresinin performanslarında büyük bir fark olmadığı görülmektedir. CTT ile geliştirilen yakıt hücresinden üretilen maksimum güç değeri 0,209 μW ve güç yoğunluğu 3,557 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 'dir. CPW'den elde edilen maksimum güç değeri ise 0,195 μW ve güç yoğunluğu 3,316 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 'dir.



Şekil 4.31. (A) SPE/CTT-Fc/GOx/Chit anodu, GDE/PtB katodunun ve (B) SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu, GDE/PtB katodunun potansiyel-akım ve yakıt hücre polarizasyon eğrisi performansları gösterilmektedir. (C) ve (D)'de ise yakıt hücrelerinin performansları karşılaştırılmıştır. Anot kısmında enzim konsantrasyonu olarak 20 mg/mL kullanmış, GDE üzerine 15 μL PtB damlatılmıştır. Testler 0,1 M PBS içerisine eklenen 5 mM glikozla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM'dir.

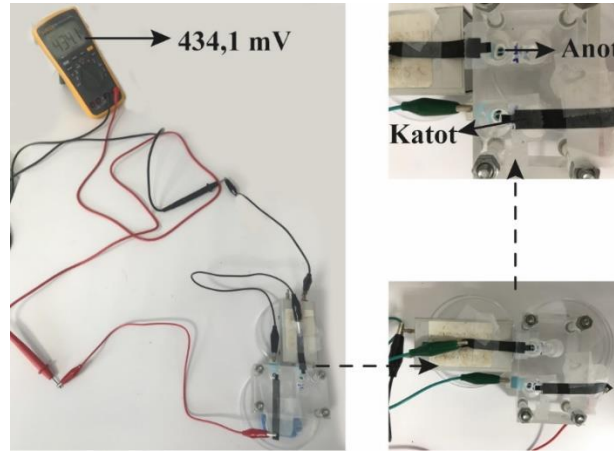
CTT ile geliştirilen yakıt hücresi CPW'ye kıyasla uygulanan direnç değerine bağlı olarak güç yoğunluğu fazladır. Bunun sebebinin yakıt hücrelerindeki teorik maksimum enerji çıkışına ulaşmasını engelleyen potansiyel kayıplardan (overpotential) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu kayıplar aktivasyon, omik ve konsantrasyon kayıpları olarak sıralanabilir (Osman vd, 2011). Düşük akımlarda aktivasyon (yük transferi) kayıpları baskındır; bunlar mediyatör veya enzimden elektrotlara elektron transferi sırasında oluşan enerji kayıplarıdır. Bu bölgedeki kayıpları azaltmak için elektrot katalizi geliştirilebilir, elektrot yüzey alanı arttırılabilir ve çalışma koşulları (sıcaklık, pH) optimize edilebilir. Düşük akım yoğunluğunda CPW'nin CTT'ye göre daha yüksek hücre potansiyeline sahip olmasının nedeninin, daha az aktivasyon kaybı olduğu düşünülmektedir. Omik kayıplar ise en çok kaybın gerçekleştiği alandır. Genellikle proton ve yük transfer direnci neden olmaktadır. Son olarak konsantrasyon kayıpları yüksek akım yoğunluğun olduğu yerlerde, anotta substratın ulaşamaması veya katotta proton difüzyonu gibi nedenlerden dolayıdır (Clauwaert vd, 2008). Grafiğe bakıldığında CPW'nin CTT'ye göre maksimum güç yoğunluğuna ulaştıktan sonra yüksek akım yoğunluğunda hücre potansiyeli hızlı bir şekilde düşmüştür. Konsantrasyon kayıplarının fazla olduğu bölgede malzemeleri kıyasladığımızda, substrattan anoda aktarılan elektronların tamamının oksitlenmediğinden şüphelenilmektedir. Dolayısıyla CPW'de maksimum güç yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra CTT'ye göre performans düşüklüğü yaşanmış olabilir. Bu nedenle yapılacak olan kararlılık testlerinde yakıt hücreleri maksimum veya maksimum güce yakın bir nokta seçilerek çalıştırılmıştır.



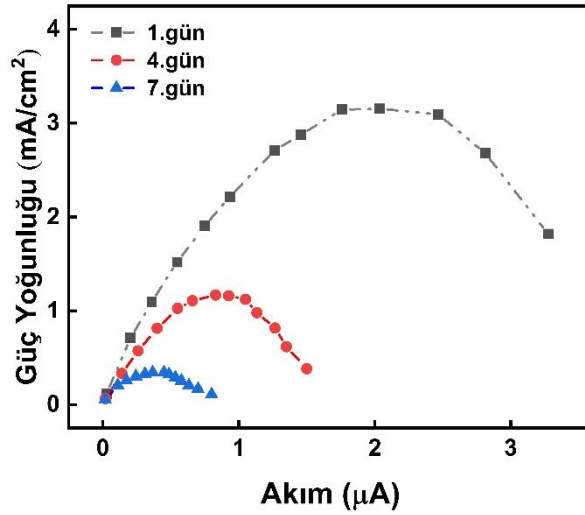
Şekil 4.32. SPE/CTT-Fc/GOx/Chi anodu ve GDE/PtB ile hazırlanmış yakıt hücrelerinin güç yoğunluğundaki değişim gösterilmektedir. Maksimum güç değerleri 80 kΩ'da elde edilmiştir. SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu ve GDE/PtB ile hazırlanmış yakıt hücrelerinin güç yoğunluğundaki değişim gösterilmektedir. Maksimum güç değerleri 100 kΩ'da elde edilmiştir. Anot kısmında enzim konsantrasyonu olarak 20 mg/mL kullanmış, katot kısmında ise GDE üzerine 15 µL PtB damlatılmıştır. Testler 0,1 M PBS içinde 5 mM glikozla, 24 °C ±2 sıcaklığında ve nefes alan hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Fc miktarı 25 mM'dır.

Hazırlanan enzimatik yakıt hücresi seçilen güç değeri süresince kararlılık testine tabi tutulmuştur ve enzimatik yakıt hücresinin zamanla güç değerindeki değişim incelenmiştir. Şekil 4.32’de yapılan kararlılık testi ile zamanla güç yoğunluğundaki değişim gösterilmektedir. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit anodu ve GDE/PtB ile hazırlanmış yakıt hücresinin kararlılık testi için maksimum güç değerleri 80 k Ω ’da elde edildi. SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu ve GDE/PtB katodu ile hazırlanmış yakıt hücresinin kararlılık testi için maksimum güç değerleri 100 k Ω ’da elde edilmiştir. Kararlılık testi gerçekleştirilen enzimatik yakıt hücrelerinin 12. saatten sonra alınan ölçümleri sonucunda CTT’nin güç yoğunluğunda %50, CPW’nin güç yoğunluğunda ise %18 ‘lik bir azalma yaşanmıştır ve CPW malzemesinin kararlılığı daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde sınırlı güç çıkışı ve sürekli çalışma altındaki yetersiz uzun vadeli stabiliteleri enzimatik yakıt hücrelerinin optimizasyonunu gerektirmektedir. Öte yandan güvenli, düşük maliyet, sürdürülebilirlik gibi özellikleri avantaj sağlamaktadır.



Şekil 4.33. Modifiye edilen yakıt hücresini seri bağlama düzeneği

Şekil 4.33’te görüldüğü gibi modifiye edilen yakıt hücreleri seri olarak bağlanmıştır ve açık devre potansiyeli (Open circuit potential, OCP) 434,1 mV olarak bulunmuştur. Bu değer tek bir yakıt hücresi için elde edilen 218,4 mV değerinin yaklaşık 2 katıdır dolayısıyla yakıt hücreleri seri bağlanarak orantısız bir OCP artışı olmuştur. Fakat sistemin en büyük dezavantajı katot kısmı tam olarak sabitlenemediği için ölçümlerde sabit değerler almak oldukça zor olmuştur. Bu problemi çözebilmek için sistem tasarımı yapıldığında istenilen güç değerlerini elde etmek mümkün olacaktır.



Şekil 4.34. SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu GDE/PtB katodu ile hazırlanmış yakıt hücresinin zamanla değişen polarizasyon eğrileri

Son olarak ise enerji sistemlerinin üretkenliğinde önemli rol oynayan kararlılık deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kararlılık, sistemin belirli bir çalışma ortamında ne kadar süre güç üretebileceğini bilimsel olarak tanımlar. Yapılacak olan bu deneyler için Şekil 4.32'teki sonuçlar incelenip SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu GDE/PtB katodu ile hazırlanmış yakıt hücresi seçilmiştir. Şekil 4.34'te görüldüğü üzere farklı günlerde enzimatik yakıt hücresinin karakterizasyonu için 5 mM glikoz konsantrasyonu ile polarizasyon eğrileri elde edilmiştir. İlk gün elde edilen maksimum güç yoğunluğu $3,153 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 'dir; dördüncü gün maksimum güç yoğunluğu $1,167 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 'dir; yedinci gün ise maksimum güç yoğunluğu $0,341 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 'dir.

Sonuçlar göstermektedir ki düşük uzun vadeli kararlılık sorunu önemli ölçüde fazladır. Gerçekleştirdiğimiz deneylerde sıcaklık kontrolü olmadığı için yakıtın buharlaşması ve dolayısıyla stabilitede değişikliklerin olabileceği düşünülmektedir. Buharlaşmayı en aza indirmek için yakıt hücresi kullanılmadığı zamanlarda 4°C 'de muhafaza edilmiştir ve her deneyden önce glikoz yenilenmiştir. Glikoz yenilenmeden ve yenilendikten sonra alınan OCP değerlerinde değişim gözlemlendiği için yapılacak olan uygulamalarda bu detayı göz önünde bulundurmak gerekir. Ayrıca, her deney sonrası glikoz çözeltisi yenilenirken elektrotların fiziksel zarar görmüş olma ihtimalinden dolayı da bir performans düşüklüğü ortaya çıkabileceği değerlendirilmiştir. Fakat, mikro elektronik sistemlerin implantasyonunun uygulanabilir olması için özellikle yakıt hücresi performansı ve stabilitesinde daha fazla iyileştirme ihtiyaç duyulmaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu tez kapsamında enzim tutuklanma işlemlerinde doğal, ucuz, kolay elde edilebilir ve çevre-dostu biyokütle kaynaklı malzemeler başarıyla sentezlenmiş ve biyoelektronik uygulamalarda test edilmiştir. Bu kapsamda TT ve PW biyokütlelerinden başarıyla karbonize malzemeler elde edilmiştir. Elde edilen CPW ve CTT'ler kullanılarak süspansiyonlar hazırlanmış, elektrotlara kaplanarak elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. CTT ve CPW için 1 mg/cm² malzeme kaplama yoğunluğunda akım değişimi, malzeme kaplanmamış SPE'ye göre yaklaşık 2 kat artmıştır. Elde edilen sonuçlara göre malzemelerin elektrokimyasal performanslarının benzer olduğu ve SEM, EDX ve Mapping sonuçları da elektrokimyasal deney sonuçlarıyla beraber değerlendirildiğinde malzemelerin benzer yapıya sahip olduğu değerlendirilmiştir.

Enzim temelli biosensör: SPE/CTT ve SPE/CPW ile modifiye edilmiş elektrotlar elektrokimyasal olarak karakterize edilmiş ve farklı modifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. En uygun modifikasyon yöntemi seçilirken hassasiyet, eğim ve doğrusal aralık parametreleri dikkate alınmıştır. Enzim tutuklandıktan sonra Chit ile yüzeyde film oluşturularak malzeme kaybı ve tutuklanmış enzimin yüzeyden ayrılmasının engellenmesi literatürle uyumlu olarak gerçekleştirilmiştir (Paik vd, 2018; Zare vd, 2017). Son olarak mediyatörün elektrot üzerine enzim ile uygulanmasının elektrokimyasal performansı arttırdığı görülmüştür ve malzeme-Fc çözeltisi yüzeye başarıyla kaplanmıştır. En uygun modifikasyon yöntemi olarak SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit belirlenmiştir. Seçilen modifikasyon yöntemi sonucunda enzim konsantrasyonu, mediyatör miktarı ve çalışma potansiyelinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon sonuçlarına göre Lineweaver ve Burk yöntemi kullanılarak elde edilen K_m değeri SPE/CTT-Fc/GOx/Chit'da 13,58 mM ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit'de 19,18 mM olarak hesaplanmıştır. Kullanılan Fc miktarını optimize etmek için farklı miktarla modifiye edilen elektrotların elektrokimyasal performansı test edilmiştir ve değişen glikoz derişimine verdiği tepki incelenmiştir. Aynı koşullarda farklı Fc miktarlarıyla hazırlanmış elektrotların standart sapma değerleri incelendiğinde malzeme-Fc çözeltisinde 25 mM Fc kullanılan elektrotların standart sapmasının daha düşük olduğu görülmüştür. Daha fazla Fc kullanılan elektrotlarda daha yüksek hassasiyet elde edilmesine rağmen, doğrusallığın daha az olduğu ve Fc'nin difüzif davranışının düşük miktarlardaki kaplamalara göre azaldığı görülmüştür. Bu nedenle malzeme-Fc çözeltisinde kullanılacak olan Fc miktarı 25 mM olarak belirlenmiştir.

Optimum şartlar altında hazırlanan SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotların tekrar üretilebilirliğini incelemek için 10 farklı elektrota 5 mM glikoz konsantrasyonu kullanılarak +0,100 V (vs Ag/Ag⁺) potansiyeli uygulanmıştır. Sırasıyla RSD değerleri %6,67 ve %12,85'tir. SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotu seçilerek geliştirilen biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin RSD değeri %8,93 olarak hesaplanmıştır. Yapılan 25 ölçümden sonra akım %28,78 azalmıştır ve yüzeyde deformasyonlar olmuştur. SPE ile modifiye edilen bu tür çalışmalar tek kullanımlık sensörler için ve tekrar üretilebilirliği incelemek için daha uygundur. Panjan vd. SPE ile geliştirdiği glikoz biyosensörün tekrar kullanılabilirliğiyle ilgili yapılan çalışmalarda da çalışma elektronun yüzeyi çok fazla zarar görmüştür; ancak biyosensörün tek kullanımı yüzeyde hasara neden olmamıştır (Panjan vd, 2017).

Geliştirilen SPE/CTT-Fc/GOx/Chit ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotlarının akım değişimleri farklı günlerde de test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sırasıyla 5 mM ve 10 mM glikoz konsantrasyonuna verilen akım cevabı; SPE/CTT-Fc/GOx/Chit elektrotu için %12,33, %30,12 ve SPE/CPW-Fc/GOx/Chit elektrotu için ise %19,56, %31,11 değişmiştir. Sensörler gerçek kan numunelerinde glikoz konsantrasyonunu (4,4 – 6,1 mM) belirlemede kullanmak için oldukça yeterli olduğu görülmüştür. Huand vd. tarafından geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliği %4,2 (n=5) ve elde edilen akım değerleri 1 ay sonunda %15 azalmıştır (Nenkova vd, 2010). Paik vd. geliştirdiği biyosensör performansı ise 4 hafta sonunda akım cinsinden %13 değişmiştir (Paik vd, 2018). Daha karmaşık ve pahalı elektrot modifikasyon yöntemlerine göre tez çalışması sonucunda geliştirilen biyosensörün raf ömrü ve tekrar üretilebilirliği literatürde verilen değerler ile benzer olarak değerlendirilmiştir.

Yüksek şeker tüketiminin obezite ve diyabet hastalıklarının artmasına sebep olduğu bilinmektedir. Şeker ilavesiz reçel formüle etmek teknolojik açıdan oldukça zordur. Çünkü şeker sadece tatlı tada değil, aynı zamanda gıda ürününün fiziko-kimyasal ve dokusal özelliklerine de katkıda bulunmaktadır. Hastalar şeker tüketimini azaltmak için tatlandırıcılar ya da diyabetik ürünleri kullanmaya yönelmişlerdir (Jribi vd, 2021). Bu sebeple tüketiciler gıdalarında bulunan bileşenleri bilmeye oldukça fazla ilgi göstermektedir. Glikoz konsantrasyonu tayini için modifikasyonu gerçekleştirilen biyosensörlerin uygulanabilirliği gerçek numuneler üzerinde değerlendirilmiştir. Literatüre bakıldığında reçellerin glikoz analizinin biyosensörler ile yapılmadığı görülmüştür. Genelde HPLC cihazı kullanılarak biyosensörlere göre daha pahalı analizler gerçekleştirilmiştir. Analizi daha ucuz ve kullanılması daha pratik olan geliştirilen biyosensörler kullanılarak gıda kalitesini tespit etmek mümkündür.

Bu kapsamda, gerçek numune uygulaması ticari bir markanın ekstra geleneksel ve diyabetik reçelleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Özellikle vişne ve çilek reçelinde üretici firmanın rapor edilen glikoz etiket değerleriyle ölçülen glikoz derişimlerinin oldukça yakın olduğu bulunmuştur.

Enzimatik Yakıt Hücresi:

Yakıt hücresinin oksijen indirgenme reaksiyonunun gerçekleştiği katot için kullanılan PtB SPE'lere başarıyla kaplanmıştır. SPE/PtB'nin elektrokimyasal performansı incelendiğinde artan O₂ konsantrasyonu altında enzimatik biyoyakıt hücrelerinin güç çıkışını arttırmak için etkili bir araç olacağı sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu sonuç yakıt hücrelerinde PtB'in katot performansını arttırmak için kullanıldığını doğrulamıştır (Ammam ve Fransaer, 2013). Fakat SPE/PtB'nin reaksiyonu sınırlayabileceği düşünüldüğünden dolayı kullanılacak olan katodun yüksek yüzey alanlı olması gerektiği öngörülmüştür. Bu nedenle yakıt hücresinin performansının katot tarafından kısıtlanmaması için GDE üzerine platin karası kaplanarak kullanılmıştır.

Yapılan enzimatik yakıt hücresi karakterizasyonu sonucunda ise malzemelerin güç performanslarında büyük bir fark olmadığı görülmektedir. CTT ile geliştirilen yakıt hücrelerinden üretilen maksimum güç değeri 0,209 μW ve güç yoğunluğu 3,557 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ dir. CPW'den ise elde edilen maksimum güç değeri 0,195 μW ve güç yoğunluğu 3,316 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ dir. Fakat, yapılan fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları benzer olsa da kararlılık sonuçlarının farklı olduğu ve CPW'nin daha kararlı sonuç verdiği görülmüştür. Maksimum güç değerleri ile yapılan kararlılık testi sonucunda 25 saatin sonunda CTT'nin güç yoğunluğu %80, CPW'nin ise %56 azalmıştır. Elde edilen güç değerleri literatürde bildirilen birçok değerden (476 mV/66,56 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Hasan vd, 2018), 320 mV/16 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Buckner vd, 2010), 330 mV/120 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Fischback vd, 2006)) daha düşüktür. OCP ve güç değerlerini arttırabilmek için daha kararlı olan SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu ve GDE/PtB katodu ile hazırlanmış 2 adet yakıt hücresi seri bağlanarak OCP değeri 434,1 mV olarak bulunmuştur.

Son olarak SPE/CPW-Fc/GOx/Chit anodu GDE/PtB katodu ile hazırlanmış yakıt hücresiyle farklı günlerde 5 mM glikoz konsantrasyonu kullanılarak polarizasyon eğrileri elde edilmiştir. İlk gün elde edilen maksimum güç yoğunluğu 3,153 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ dir; dördüncü gün maksimum güç yoğunluğu 1,167 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ dir; yedinci gün ise maksimum güç yoğunluğu 0,341 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ dir. Sonuçlar kısa-uzun vadeli kararlılık sorununun önemli ölçüde fazla olduğunu göstermiştir.

5.2. Öneriler

Tez çalışması kapsamında geliştirilen biyosensörlerin performans parametrelerini geliştirmek için yapılan optimizasyonlar genişletilebilir. Bu kapsamda, Semenova vd. tarafından yapılan çalışmada mediyatör olarak kullanılan Prusya Mavisi (PM) SPE'ler üzerine enzim/membran tabakası ile kaplanmıştır ve biyosensör geliştirilmiştir. Fazla PM konsantrasyonu kullanıldığında yüksek tarama hızlarında piklerde bir kayma meydana gelmiştir. Bunun sonucunda kullanılan enzim/membran tabakası kalınlaştırılarak bu problem çözülmüştür (Semenova vd, 2018). Bu nedenle bu çalışmada kullanılan 75 mM Fc ile modifiye edilen elektrotlarda da Chit kalınlığı artırılarak yüksek tarama hızlarında piklerde meydana gelen kaymalar engellenebilir.

Geliştirilen enzimatik yakıt hücrelerinin güç değerlerinin performansını arttırmak için; özellikle seri bağlanan hücrelerde katot kısmının sabit olduğu hücre tasarımları gerçekleştirilebilir ya da DC-DC dönüştürücüler kullanarak istenilen güç değerini elde etmek mümkün olacaktır. Sürekli yakıt sağlayan sistemler bütünleştirilerek cihazların şarj gereksinimi olmadan çalışması sağlanabilir. Her tasarım belirli sorunları ele alır ve bir çözüm sunar; ancak aynı anda sınırlı güç çıkışı ve düşük uzun vadeli kararlılık sorunlarının tümünü kapsayan kesin çözümler yoktur. Sınırlı güç çıkışı ve özellikle uzun süreli ve sürekli ölçüm gerektiren uygulamalar için elde edilen kararlılık sonuçlarının daha iyi bir noktaya taşınabilmesi için daha detaylı optimizasyon çalışmaları gerekmektedir. Enzimatik yakıt hücresinin anodunun yüksek bir performansta çalışmasına rağmen düşük güç çıkışı elde edilmesinin sebebi olarak Chit'den kaynaklı engellenen proton transferiyle açıklanabilir. Bu nedenle gelecekteki çalışmalarda anot değiştirilmeden katot geliştirilmesine odaklanılabilir. Gelecekteki çalışmaların enzimatik yakıt hücresi performansını iyileştirilebilmesi için uygulanabilecek yaklaşımlardan birisi de kullanılan enzimlerin (örn. mutant enzimler) veya yakıt hücresi tasarımının (mikroakışkan kanallı çipler veya sürekli beslemeleri hücreler) değiştirilmesi olabilir.

KAYNAKÇA

- Abdelkareem, M. A., Elsaid, K., Wilberforce, T., Kamil, M., Sayed, E. T., & Olabi, A.** (2021). Environmental aspects of fuel cells: A review. *Science of the Total Environment*, 752. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141803
- Akshaya, K., Bhat, V. S., Varghese, A., George, L., & Hegde, G.** (2019). Non-enzymatic electrochemical determination of progesterone using carbon nanospheres from onion peels coated on carbon fiber paper. *Journal of the Electrochemical Society*, 166(13), B1097.
- Amirdehi, M. A., Gong, L., Khodaparastasarabad, N., Sonawane, J. M., Logan, B. E., & Greener, J.** (2022). Hydrodynamic interventions and measurement protocols to quantify and mitigate power overshoot in microbial fuel cells using microfluidics. *Electrochimica Acta*, 405, 139771.
- Ammam, M., & Fransaer, J.** (2013). Combination of laccase and catalase in construction of H₂O₂-O₂ based biocathode for applications in glucose biofuel cells. *Biosensors & Bioelectronics*, 39(1), 274-281. doi:10.1016/j.bios.2012.07.066
- Anisuzzaman, S. M., Joseph, C. G., Daud, W., Krishnaiah, D., & Yee, H. S.** (2015). Preparation and characterization of activated carbon from *Typha orientalis* leaves. *International Journal of Industrial Chemistry*, 6(1), 9-21. doi:10.1007/s40090-014-0027-3
- Anonim. (2006). *Türk Gıda Kodeksi Reçel, Jöle, Marmelat ve Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (No:2006/53)*.
- Anonim.** (2022). Standard Addition Method. Retrieved from [Erişim Tarihi: 12.12.2022 <https://www.asi-sensors.com/index.php/resources-learning/educational-learning/1-ise-standards-additions-method/file>]
- Ardakani, H. K., Gerami, M., Chashmpoosh, M., Omidifar, N., & Gholami, A.** (2022). Recent Progress in Nanobiosensors for Precise Detection of Blood Glucose Level. *Biochemistry Research International*, 2022. doi:10.1155/2022/2964705
- Asaduzzaman, M., Zahed, M. A., Sharifuzzaman, M., Reza, M. S., Hui, X., Sharma, S., . . . Park, J. Y.** (2023). A hybridized nano-porous carbon reinforced 3D graphene-based epidermal patch for precise sweat glucose and lactate analysis. *Biosensors and bioelectronics*, 219, 114846. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114846>

- Atanasov, P., & Wilkins, E.** (1994). Biosensor for continuous glucose monitoring. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(3), 262-266. doi:10.1002/bit.260430310
- Bandodkar, A. J., You, J.-M., Kim, N.-H., Gu, Y., Kumar, R., Mohan, A. V., . . . Parish, B.** (2017). Soft, stretchable, high power density electronic skin-based biofuel cells for scavenging energy from human sweat. *Energy & Environmental Science*, 10(7), 1581-1589.
- Bauer, M., Duerkop, A., & Baeumner, A. J.** (2022). Critical review of polymer and hydrogel deposition methods for optical and electrochemical bioanalytical sensors correlated to the sensor's applicability in real samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi:10.1007/s00216-022-04363-2
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P.** (2016). Introduction to biosensors. *Essays Biochem*, 60(1), 1-8. doi:10.1042/ebc20150001
- Bhat, V. S., Supriya, S., & Hegde, G.** (2019). Biomass derived carbon materials for electrochemical sensors. *Journal of the Electrochemical Society*, 167(3), 037526.
- Bilge, S., Bakirhan, N. K., Donar, Y. O., Sinag, A., Ozkan, S. A., & Okudan, E. Ş.** (2020). Green synthesis of carbon based biosensor materials from algal biomass for the sensitive detection of vardenafil. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 871, 114286. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114286>
- Bridgwater, T.** (2006). Biomass for energy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12), 1755-1768. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.2605>
- Brown, R. J. C., & Mustoe, C. L.** (2014). Demonstration of a standard dilution technique for standard addition calibration. *Talanta*, 122, 97-100. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.014>
- Buckner, S. W., Jelliss, P. A., Nukic, A., Zalocusky, E. R., & Schumacher, J.** (2010). A metallocarborane redox mediator for an enzyme-immobilized chitosan-modified bioanode. *Bioelectrochemistry*, 78(2), 130-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.09.002>
- Burns, D. T., & Walker, M. J.** (2019). Origins of the method of standard additions and of the use of an internal standard in quantitative instrumental chemical analyses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(13), 2749-2753. doi:10.1007/s00216-019-01754-w

Cambridge, U. o. (2022). Linear Sweep and Cyclic Voltametry: The Principles. Retrieved from <https://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/Edu/linear-sweep-and-cyclic-voltametry-the-principles>

Cemal, K., KIVRAK, A., & Yasemin, E. (2012). Ticari çilek, kayısı ve vişne reçellerinin özellikleri. *Akademik Gıda*, 10(4), 31-36.

Cemeroğlu, B. (1992). Meyve ve sebze işleme endüstrisinde temel analiz metotları. *Biltav Yayınları, Ankara*, 381.

Chang, C. S., Li, M., Niu, P., Zhang, L., & Wang, S. L. (2021). A facile dual-functional hydrothermal-assisted synthesis strategy of hierarchical porous carbon for enhanced supercapacitor performance. *Sustainable Materials and Technologies*, 28. doi:10.1016/j.susmat.2021.e00265

Chansaenpak, K., Kamkaew, A., Lisnund, S., Prachai, P., Ratwirunkit, P., Jingpho, T., . . . Pinyou, P. (2021). Development of a Sensitive Self-Powered Glucose Biosensor Based on an Enzymatic Biofuel Cell. *Biosensors-Basel*, 11(1). doi:10.3390/bios11010016

Chen, C., Wang, L., Tan, Y., Qin, C., Xie, F., Fu, Y., . . . Yao, S. (2011). High-performance amperometric biosensors and biofuel cell based on chitosan-strengthened cast thin films of chemically synthesized catecholamine polymers with glucose oxidase effectively entrapped. *Biosensors and bioelectronics*, 26(5), 2311-2316. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.058>

Chen, C., Xie, Q., Yang, D., Xiao, H., Fu, Y., Tan, Y., & Yao, S. (2013). Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *Rsc Advances*, 3(14), 4473-4491.

Chen, X., Jia, J., & Dong, S. (2003). Organically modified sol-gel/chitosan composite based glucose biosensor. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 15(7), 608-612.

Chung, Y., Tannia, D. C., & Kwon, Y. (2018). Glucose biofuel cells using bi-enzyme catalysts including glucose oxidase, horseradish peroxidase and terephthalaldehyde crosslinker. *Chemical Engineering Journal*, 334, 1085-1092. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.121>

Clark Jr, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1), 29-45.

Clarke, S., & Preto, F. (2011). *Biomass burn characteristics*: Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs Guelph, ON, Canada.

Clauwaert, P., Aelterman, P., Pham, T. H., De Schampelaire, L., Carballa, M., Rabaey, K., & Verstraete, W. (2008). Minimizing losses in bio-electrochemical systems: the road to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(6), 901-913. doi:10.1007/s00253-008-1522-2

D'Orazio, P. (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 334(1-2), 41-69.

Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9.

Dicks, A. L. (2006). The role of carbon in fuel cells. *Journal of Power Sources*, 156(2), 128-141.

Energy, R. (2016). What is Biomass? Website: <http://www.aesenergy.net/biomassenergy.html>. Accessed, 4(8), 09.

Erkal, A., Aşık, İ., Yavuz, S., Kariper, A., & Üstündağ, Z. (2016). Biosensor application of carbonaceous nanocoil material: preparation, characterization, and determination of dopamine and uric acid in the presence of ascorbic acid. *Journal of the Electrochemical Society*, 163(5), H269.

Escalona-Villalpando, R. A., Sandoval-Garcia, A., Espinosa, L. J. R., Miranda-Silva, M. G., Arriaga, L. G., Minter, S. D., & Ledesma-Garcia, J. (2021). A self-powered glucose biosensor device based on microfluidics using human blood. *Journal of Power Sources*, 515. doi:10.1016/j.jpowsour.2021.230631

Fatoni, A., Numnuam, A., Kanatharana, P., Limbut, W., Thammakhet, C., & Thavarungkul, P. (2013). A highly stable oxygen-independent glucose biosensor based on a chitosan-albumin cryogel incorporated with carbon nanotubes and ferrocene. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185, 725-734. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.05.056>

Fatoni, A., Widanarto, W., Anggraeni, M. D., & Dwiasi, D. W. (2022). Glucose biosensor based on activated carbon – NiFe₂O₄ nanoparticles composite modified carbon paste electrode. *Results in Chemistry*, 4, 100433. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100433>

- Fischback, M. B., Youn, J. K., Zhao, X., Wang, P., Park, H. G., Chang, H. N., . . . Ha, S.** (2006). Miniature Biofuel Cells with Improved Stability Under Continuous Operation. *Electroanalysis*, 18(19-20), 2016-2022. doi:<https://doi.org/10.1002/elan.200603626>
- Franks, A. E., & Nevin, K. P.** (2010). Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies*, 3(5), 899-919.
- Fujita, S., Yamanoi, S., Murata, K., Mita, H., Samukawa, T., Nakagawa, T., . . . Tokita, Y.** (2014). A repeatedly refuelable mediated biofuel cell based on a hierarchical porous carbon electrode. *Scientific reports*, 4(1), 1-8.
- Gamella, M., Koushanpour, A., & Katz, E.** (2018). Biofuel cells—activation of micro-and macro-electronic devices. *Bioelectrochemistry*, 119, 33-42.
- Ganesan, S., Sivam, S., Elanchezian, M., Senthilkumar, S., Ramakrishan, S. G., Soundappan, T., & Ponnusamy, V. K.** (2022). Novel delipidated chicken feather waste-derived carbon-based molybdenum oxide nanocomposite as efficient electrocatalyst for rapid detection of hydroquinone and catechol in environmental waters*. *Environmental Pollution*, 293. doi:10.1016/j.envpol.2021.118556
- Gavrilaş, S., Ursachi, C. Ş., Perţa-Crişan, S., & Munteanu, F.-D.** (2022). Recent Trends in Biosensors for Environmental Quality Monitoring. *Sensors*, 22(4), 1513.
- Gong, Y., Li, D., Luo, C., Fu, Q., & Pan, C.** (2017). Highly porous graphitic biomass carbon as advanced electrode materials for supercapacitors. *Green Chemistry*, 19(17), 4132-4140. doi:10.1039/C7GC01681F
- Grattieri, M., & Minter, S. D.** (2018). Self-Powered Biosensors. *Acs Sensors*, 3(1), 44-53. doi:10.1021/acssensors.7b00818
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J., & Reimhult, E.** (2008). Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400-1458. doi:10.3390/s8031400
- Gupta, U., Gupta, V., Arun, R. K., & Chanda, N.** (2022). Recent advances in enzymatic biosensors for point-of-care detection of biomolecules. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(12), 3393-3407. doi:10.1002/bit.28251
- Gupta, U., Gupta, V., Arun, R. K., & Chanda, N.** (2022). Recent advances in enzymatic biosensors for point-of-care detection of biomolecules. *Biotechnology and Bioengineering*.

- Güleşen, M., Erkal-Aytemur, A., Yavuz, S., Akbulut, A., Kariper, İ. A., & Üstündağ, İ.** (2019). Evaluation of nanomanganese decorated typha tassel carbonaceous electrode: preparation, characterization, and simultaneous determination of Cd²⁺ and Pb²⁺. *Chemical Papers*, 73(11), 2869-2878.
- Habermüller, K., Mosbach, M., & Schuhmann, W.** (2000). Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 366(6), 560-568.
- Han, S.-Y., Park, C.-W., Lee, E.-A., Park, J.-S., Kwon, G.-J., Kim, N.-H., & Lee, S.-H.** (2021). Pretreatment of pussy willow and Korean pine using various ionic liquids and their mixtures with organic solvents for enzymatic saccharification. *BioResources*, 16(1), 455.
- Harris, D. C.** (2011). *Quantitative chemical analysis, eighth edition*: New York, NY : W.H. Freeman and Co., [2011] ©2011.
- Hasan, M. Q., Slaughter, G., & Ieee.** (2018, Oct 28-31). *Hybrid Glucose/O-2 biofuel cell based on as pyroquinoline quinone glucose dehydrogenase at the bioanode*. Paper presented at the 17th IEEE SENSORS Conference, New Delhi, INDIA.
- Herkendell, K.** (2021). Status Update on Bioelectrochemical Systems: Prospects for Carbon Electrode Design and Scale-Up. *Catalysts*, 11(2), 278.
- Hoang Hiep, N., It, sup, gt, It, sup, . . . gt.** (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157-163.
- Hovancová, J., Šišoláková, I., Oriňáková, R., & Oriňak, A.** (2017). Nanomaterial-based electrochemical sensors for detection of glucose and insulin. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 21(8), 2147-2166. doi:10.1007/s10008-017-3544-0
- Hu, B., Wang, K., Wu, L., Yu, S.-H., Antonietti, M., & Titirici, M.-M.** (2010). Engineering Carbon Materials from the Hydrothermal Carbonization Process of Biomass. *Advanced Materials*, 22(7), 813-828. doi:<https://doi.org/10.1002/adma.200902812>
- Huang, X., Zhang, L., Zhang, Z., Guo, S., Shang, H., Li, Y., & Liu, J.** (2019). Wearable biofuel cells based on the classification of enzyme for high power outputs and lifetimes. *Biosensors and bioelectronics*, 124, 40-52.
- Ivnitski, D., Branch, B., Atanassov, P., & Apblett, C.** (2006). Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer. *Electrochemistry communications*, 8(8), 1204-1210.

- Jackson, M., & Mantsch, H. H.** (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30(2), 95-120. doi:10.3109/10409239509085140
- Jayakumar, K., Bennett, R., & Leech, D.** (2021). Electrochemical glucose biosensor based on an osmium redox polymer and glucose oxidase grafted to carbon nanotubes: A design-of-experiments optimisation of current density and stability. *Electrochimica Acta*, 371, 137845.
- Ji, J., Kim, S., Chung, Y., & Kwon, Y.** (2022). Polydopamine mediator for glucose oxidation reaction and its use for membraneless enzymatic biofuel cells. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 111, 263-271. doi:10.1016/j.jiec.2022.04.006
- Jia, W. Z., Wang, K., Zhu, Z. J., Song, H. T., & Xia, X. H.** (2007). One-step immobilization of glucose oxidase in a silica matrix on a Pt electrode by an electrochemically induced sol-gel process. *Langmuir*, 23(23), 11896-11900. doi:10.1021/la7020269
- Jin, H., Li, J., Yuan, Y., Wang, J., Lu, J., & Wang, S.** (2018). Recent Progress in Biomass-Derived Electrode Materials for High Volumetric Performance Supercapacitors. *Advanced Energy Materials*, 8(23), 1801007. doi:<https://doi.org/10.1002/aenm.201801007>
- Jribi, S., Ouhaibi, M., Boukhris, H., Damergi, C., & Debbabi, H.** (2021). Formulations of low-sugar strawberry jams: quality characterization and acute post-prandial glycaemic response. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(2), 1578-1587. doi:10.1007/s11694-020-00747-z
- Katz, E., Bückmann, A. F., & Willner, I.** (2001). Self-powered enzyme-based biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 123(43), 10752-10753.
- Krajewska, B.** (2004). Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and microbial technology*, 35(2-3), 126-139.
- Kulkarni, M. B., Ayachit, N. H., & Aminabhavi, T. M.** (2022). Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application. *Biosensors-Basel*, 12(7). doi:10.3390/bios12070543
- Kyvik, K. O., Traulsen, J., Reinholdt, B., & Frøland, A.** (1990). The ExacTech blood glucose testing system. *Diabetes Res Clin Pract*, 10(1), 85-90. doi:10.1016/0168-8227(90)90085-8

- Labrecque, M., & Teodorescu, T. I.** (2003). High biomass yield achieved by Salix clones in SRIC following two 3-year coppice rotations on abandoned farmland in southern Quebec, Canada. *Biomass & Bioenergy*, 25(2), 135-146. doi:10.1016/s0961-9534(02)00192-7
- Lee, H. U., Yoo, H. Y., Lkhagvasuren, T., Song, Y. S., Park, C., Kim, J., & Kim, S. W.** (2013). Enzymatic fuel cells based on electrodeposited graphite oxide/cobalt hydroxide/chitosan composite-enzyme electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, 42, 342-348. doi:10.1016/j.bios.2012.10.020
- Leech, D., Kavanagh, P., & Schuhmann, W.** (2012). Enzymatic fuel cells: Recent progress. *Electrochimica Acta*, 84, 223-234.
- Li, H., Pan, L., Lu, T., Zhan, Y., Nie, C., & Sun, Z.** (2011). A comparative study on electrosorptive behavior of carbon nanotubes and graphene for capacitive deionization. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653(1-2), 40-44.
- Li, T. T., Li, Y. H., Wang, C. Y., Gao, Z. D., & Song, Y. Y.** (2015). Nitrogen-doped carbon nanospheres derived from cocoon silk as metal-free electrocatalyst for glucose sensing. *Talanta*, 144, 1245-1251. doi:10.1016/j.talanta.2015.08.005
- Li, X., Li, H., Liu, T., Hei, Y., Hassan, M., Zhang, S., . . . Zhou, M.** (2018). The biomass of ground cherry husks derived carbon nanoplates for electrochemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 3248-3256. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.151>
- Lin, Y.-C., Shangdiar, S., Chen, S.-C., Cho, C.-A., & Datov, A.** (2021). A study on different parameters affecting the saccharification rate of Typha orientalis pretreated with Ionic Liquids (ILs) and microwave irradiation for bioethanol production by using response surface methodology. *Catalysis Communications*, 150, 106265.
- Lister, A. S.** (2005). 7 - Validation of HPLC Methods in Pharmaceutical Analysis. In S. Ahuja & M. W. Dong (Eds.), *Separation Science and Technology* (Vol. 6, pp. 191-217): Academic Press.
- Liu, Y. Q., Luo, X. J., Yu, Q., Ye, L., Yang, L., & Cui, Y.** (2022). Review of point-of-care platforms for diabetes: (1) sensing. *Sensors and Actuators Reports*, 4. doi:10.1016/j.snr.2022.100113
- MacVittie, K., Halánek, J., Halámková, L., Southcott, M., Jemison, W. D., Lobel, R., & Katz, E.** (2013). From “cyborg” lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells. *Energy & Environmental Science*, 6(1), 81-86.

- Mano, N., Mao, F., & Heller, A.** (2003). Characteristics of a miniature compartment-less glucose– O₂ biofuel cell and its operation in a living plant. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(21), 6588-6594.
- Maradin, D.** (2021). Advantages and disadvantages of renewable energy sources utilization. *670216917*.
- McKendry, P.** (2002). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*, *83*(1), 37-46. doi:10.1016/s0960-8524(01)00118-3
- Mehrotra, P.** (2016). Biosensors and their applications—A review. *Journal of oral biology and craniofacial research*, *6*(2), 153-159.
- Mekhilef, S., Saidur, R., & Safari, A.** (2012). Comparative study of different fuel cell technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*(1), 981-989.
- Mohammadpour-Haratbar, A., Mohammadpour-Haratbar, S., Zare, Y., Rhee, K. Y., & Park, S.-J.** (2022). A Review on Non-Enzymatic Electrochemical Biosensors of Glucose Using Carbon Nanofiber Nanocomposites. *Biosensors*, *12*(11), 1004.
- Mohd Said, N. A.** (2014). *Electrochemical biosensor based on microfabricated electrode arrays for life sciences applications*. University College Cork.
- Monteiro, T., & Almeida, M. G.** (2019). Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited: Old Solutions for New Problems. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *49*(1), 44-66. doi:10.1080/10408347.2018.1461552
- Nada, A. A. I., Arman, S., & Safaei, B.** (2022). A novel review on the efficiency of nanomaterials for solar energy storage systems. *Journal of Energy Storage*, *55*. doi:10.1016/j.est.2022.105661
- Naebe, M., Wang, J., Amini, A., Khayyam, H., Hameed, N., Li, L. H., . . . Fox, B.** (2014). Mechanical property and structure of covalent functionalised graphene/epoxy nanocomposites. *Scientific reports*, *4*(1), 1-7.
- Nanda, S., Mohanty, P., Pant, K. K., Naik, S., Kozinski, J. A., & Dalai, A. K.** (2013). Characterization of North American lignocellulosic biomass and biochars in terms of their candidacy for alternate renewable fuels. *Bioenergy Research*, *6*(2), 663-677.
- Naresh, V., & Lee, N.** (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, *21*(4), 1109.

- Nenkova, R., Ivanova, D., Vladimirova, J., & Godjevargova, T.** (2010). New amperometric glucose biosensor based on cross-linking of glucose oxidase on silica gel/multiwalled carbon nanotubes/polyacrylonitrile nanocomposite film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *148*, 59-65. doi:10.1016/j.snb.2010.05.034
- Nunes, E. W., Silva, M. K. L., Rascon, J., Leiva-Tafur, D., Lapa, R. M. L., & Cesarino, I.** (2022). Acetylcholinesterase Biosensor Based on Functionalized Renewable Carbon Platform for Detection of Carbaryl in Food. *Biosensors-Basel*, *12*(7). doi:10.3390/bios12070486
- Olabi, A. G., Onumaegbu, C., Wilberforce, T., Ramadan, M., Abdelkareem, M. A., & Al-Alami, A. H.** (2021). Critical review of energy storage systems. *Energy*, *214*. doi:10.1016/j.energy.2020.118987
- Osman, M., Shah, A., & Walsh, F.** (2011). Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells. *Biosensors and bioelectronics*, *26*(7), 3087-3102.
- Østergaard, P. A., Duic, N., Noorollahi, Y., Mikulcic, H., & Kalogirou, S.** (2020). Sustainable development using renewable energy technology (Vol. 146, pp. 2430-2437): Elsevier.
- Paik, E. S., Kim, Y. R., & Hong, H. G.** (2018). Amperometric Glucose Biosensor Utilizing Zinc Oxide-chitosan-glucose Oxidase Hybrid Composite Films on Electrodeposited Pt-Fe(III). *Analytical Sciences*, *34*(11), 1271-1276. doi:10.2116/analsci.18P054
- Panjan, P., Virtanen, V., & Sesay, A. M.** (2017). Determination of stability characteristics for electrochemical biosensors via thermally accelerated ageing. *Talanta*, *170*, 331-336. doi:10.1016/j.talanta.2017.04.011
- Pawlyta, M., Rouzaud, J.-N., & Duber, S.** (2015). Raman microspectroscopy characterization of carbon blacks: Spectral analysis and structural information. *Carbon*, *84*, 479-490.
- Portaccio, M., Di Tuoro, D., Arduini, F., Moscone, D., Cammarota, M., Mita, D. G., & Lepore, M.** (2013). Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified with thionine-carbon black nanocomposite, for Bisphenol A detection. *Electrochimica Acta*, *109*, 340-347. doi:<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.07.129>
- Radoń, A., & Łukowiec, D.** (2017). Structure of nanographite synthesised by electrochemical oxidation and exfoliation of polycrystalline graphite. *Micro & Nano Letters*, *12*(12), 955-959.

- Ramanavicius, A., Kausaite, A., & Ramanaviciene, A.** (2008). Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol. *Biosensors and bioelectronics*, 24(4), 761-766. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.06.048>
- Rapp, B. E., Gruhl, F. J., & Lange, K.** (2010). Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(6), 2403-2412. doi:10.1007/s00216-010-3906-2
- Rasmussen, M., Abdellaoui, S., & Minteer, S. D.** (2016). Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements. *Biosensors and bioelectronics*, 76, 91-102.
- Reid, R. C., & Mahbub, I.** (2020). Wearable self-powered biosensors. *Current Opinion in Electrochemistry*, 19, 55-62. doi:10.1016/j.coelec.2019.10.002
- Rezaei, B., & Irannejad, N.** (2019). Electrochemical detection techniques in biosensor applications *Electrochemical biosensors* (pp. 11-43): Elsevier.
- Robinson, P. K.** (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*, 59, 1-41. doi:10.1042/bse0590001
- Schirone, L., & Pellitteri, F.** (2017). Energy Policies and Sustainable Management of Energy Sources. *Sustainability*, 9(12), 2321.
- Semenova, D., Zubov, A., Silina, Y. E., Micheli, L., Koch, M., Fernandes, A. C., & Gernaey, K. V.** (2018). Mechanistic modeling of cyclic voltammetry: A helpful tool for understanding biosensor principles and supporting design optimization. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 259, 945-955. doi:10.1016/j.snb.2017.12.088
- Serag, E., El-Maghraby, A., & El Nemr, A.** (2022). Recent developments in the application of carbon-based nanomaterials in implantable and wearable enzyme-biofuel cells. *Carbon Letters*, 32(2), 395-412. doi:10.1007/s42823-021-00299-2
- Serrano, N., Alberich, A., Díaz-Cruz, J. M., Ariño, C., & Esteban, M.** (2013). Coating methods, modifiers and applications of bismuth screen-printed electrodes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 46, 15-29.
- Sha, T., Li, X., Liu, J., Sun, M., Wang, N., Bo, X., . . . Zhou, M.** (2018). Biomass waste derived carbon nanoballs aggregation networks-based aerogels as electrode material for electrochemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 277, 195-204. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.011>

- Shen, Y. L., Sun, S. J., Yang, M., & Zhao, X. Y.** (2019). Typha-derived hard carbon for high-performance sodium ion storage. *Journal of Alloys and Compounds*, 784, 1290-1296. doi:10.1016/j.jallcom.2019.01.021
- Shuler, M. L., Kargi, F., & DeLisa, M.** (2002). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. New York City, NY: Pearson.
- Silva, M. K. L., Leão, A. L., Sain, M., & Cesarino, I.** (2021). A functionalized renewable carbon-based surface for sensor development. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 25(3), 1093-1099. doi:10.1007/s10008-020-04882-x
- Simsek, V.** (2015). *Synthesis, characterization and investigation catalytic activity in the glycerol esterification reaction of acidic catalyst*. Ph. D. Thesis, Gazi university graduate school of natural and applied
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R.** (2017). *Principles of instrumental analysis*: Cengage learning.
- Southcott, M., MacVittie, K., Halámek, J., Halámková, L., Jemison, W. D., Lobel, R., & Katz, E.** (2013). A pacemaker powered by an implantable biofuel cell operating under conditions mimicking the human blood circulatory system – battery not included. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(17), 6278-6283. doi:10.1039/C3CP50929J
- Stambouli, A. B.** (2011). Fuel cells: The expectations for an environmental-friendly and sustainable source of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4507-4520.
- Stevanovic, S., & Stevanovic, S.** (2022). Biomass as a renewable energy source. *Ekonomika Poljoprivreda-Economics of Agriculture*, 69(1), 195-209. doi:10.5937/ekoPolj2201195S
- Şahin, S.** (2019). Electrochemical Characterization of Carbonized Typha Tassel Modified ScreenPrinted Electrode and Its Enzymatic Glucose Oxidation Application. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 47(3), 287-294.
- Şahin, S.** (2017). *Development of enzymatic fuel cells with pyranose-2-oxidase*. Newcastle University.
- Şahin, S., Wongnate, T., Chuaboon, L., Chaiyen, P., & Yu, E. H.** (2018). Enzymatic fuel cells with an oxygen resistant variant of pyranose-2-oxidase as anode biocatalyst. *Biosensors and bioelectronics*, 107, 17-25.

- Tinikul, R., Trisrivirat, D., Chinantuya, W., Wongnate, T., Watthaisong, P., Phonbuppha, J., & Chaiyen, P.** (2022). Detection of cellular metabolites by redox enzymatic cascades. *Biotechnology Journal*, 17(6). doi:10.1002/biot.202100466
- Uslu, B., & Ozkan, S. A.** (2007). Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Analytical Letters*, 40(5), 817-853.
- Wang, J.** (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews*, 108(2), 814-825.
- Wang, J., Kong, H., Zhang, J. Y., Hao, Y., Shao, Z. P., & Ciucci, F.** (2021). Carbon-based electrocatalysts for sustainable energy applications. *Progress in Materials Science*, 116. doi:10.1016/j.pmatsci.2020.100717
- Wang, J. L., & Wang, S. Z.** (2019). Preparation, modification and environmental application of biochar: A review. *Journal of Cleaner Production*, 227, 1002-1022. doi:10.1016/j.jclepro.2019.04.282
- Wilson, R., & Turner, A.** (1992). Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and bioelectronics*, 7(3), 165-185.
- Winter, M., & Brodd, R. J.** (2004). What Are Batteries, Fuel Cells, and Supercapacitors? *Chemical reviews*, 104(10), 4245-4270. doi:10.1021/cr020730k
- Xiang, Q.** (2011, Sep 17-18). *The Development and Application of Electrochemical Biosensor*. Paper presented at the International Conference on Computing, Information and Control (ICCIC 2011), Wuhan, PEOPLES R CHINA.
- Xiao, X., Xia, H.-q., Wu, R., Bai, L., Yan, L., Magner, E., . . . Liu, A.** (2019). Tackling the challenges of enzymatic (bio) fuel cells. *Chemical reviews*, 119(16), 9509-9558.
- Yahiro, A., Lee, S., & Kimble, D.** (1964). Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Biophysical Subjects*, 88(2), 375-383.
- Zafar, H., Channa, A., Jeoti, V., & Stojanovic, G. M.** (2022). Comprehensive Review on Wearable Sweat-Glucose Sensors for Continuous Glucose Monitoring. *Sensors*, 22(2). doi:10.3390/s22020638
- Zare, H., Najafpour, G. D., Jahanshahi, M., Rahimnejad, M., & Rezvani, M.** (2017). Highly stable biosensor based on glucose oxidase immobilized in chitosan film for diagnosis of diabetes. *Romanian Biotechnological Letters*, 22(3), 12611-12619.

- Zebda, A., Alcaraz, J. P., Vadgama, P., Shleev, S., Minteer, S. D., Boucher, F., . . . Martin, D. K.** (2018). Challenges for successful implantation of biofuel cells. *Bioelectrochemistry*, *124*, 57-72. doi:10.1016/j.bioelechem.2018.05.011
- Zebda, A., Cosnier, S., Alcaraz, J.-P., Holzinger, M., Le Goff, A., Gondran, C., . . . Lamraoui, H.** (2013). Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices. *Scientific reports*, *3*(1), 1-5.
- Zhang, L. L., & Zhao, X.** (2009). Carbon-based materials as supercapacitor electrodes. *Chemical Society Reviews*, *38*(9), 2520-2531.
- Zhang, L. X., Liu, Z. H., Cui, G. L., & Chen, L. Q.** (2015). Biomass-derived materials for electrochemical energy storages. *Progress in Polymer Science*, *43*, 136-164. doi:10.1016/j.progpolymsci.2014.09.003
- Zhang, Z. P., Yang, S. X., Li, H. Y., Zan, Y. X., Li, X. Y., Zhu, Y., . . . Wang, F.** (2019). Sustainable Carbonaceous Materials Derived from Biomass as Metal-Free Electrocatalysts. *Advanced Materials*, *31*(13). doi:10.1002/adma.201805718
- Zhao, L., Fan, L. Z., Zhou, M. Q., Guan, H., Qiao, S. Y., Antonietti, M., & Titirici, M. M.** (2010). Nitrogen-Containing Hydrothermal Carbons with Superior Performance in Supercapacitors. *Advanced Materials*, *22*(45), 5202-+. doi:10.1002/adma.201002647
- Zou, Y., Xiang, C., Sun, L. X., & Xu, F.** (2008). Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO(2) sol-gel. *Biosens Bioelectron*, *23*(7), 1010-1016. doi:10.1016/j.bios.2007.10.009