T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FENOLİK MADDE TAYİNİ İÇİN LAKKAZ TEMELLİ AMPEROMETRİK BİR BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE GIDA ANALİZİNDE KULLANIMI

BERKAY ERGENE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UYGULAMALI BİLİMLER VE TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Didem TUNCAY

EDİRNE-2021

Berkay ERGENE'nin hazırladığı "**Fenolik Madde Tayini için Lakkaz Temelli Amperometrik Bir Biyosensör Geliştirilmesi ve Gıda Analizinde Kullanımı**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Uygulamalı Bilimler ve Teknoloji Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Dr. Öğretim Üyesi Didem TUNCAY	……
Dr. Öğretim Üyesi Engin ASAV	……
Dr. Öğretim Üyesi Hatice PALÜZAR	……

Tez Savunma Tarihi: 18/11/2021

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Didem TUNCAY

Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UYGULAMALI BİLİMLER VE TEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

18/11/2021

Berkay ERGENE

Yüksek Lisans Tezi

Fenolik Madde Tayini için Lakkaz Temelli Amperometrik Bir Biyosensör Geliştirilmesi ve Gıda Analizinde Kullanımı

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Uygulamalı Bilimler ve Teknoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Gıdaların karakterizasyonunda ve insan sağlığına olası etkilerinin ortaya çıkarılmasında fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Gıdalarda fenolik bileşik analizi için geleneksel teknikler maliyetlidir ve zaman alan numune hazırlama adımları gerektirir. Günümüzde biyosensörler, bu tür geleneksel tekniklere alternatif olarak fenolik bileşikler için güvenilir, uygun maliyetli, pratik ve yerinde analizlere olanak sağlamaktadır.

Bu tezde, toplam fenolik bileşik tayini için basit ve kullanımı kolay bir lakkaz temelli amperometrik biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *Trametes versicolor* ticari lakkazı, tutuklama yöntemiyle jelatine immobilize edildi. Karbon pasta elektrot, immobilize enzimin grafit tozu ve mineral yağ ile homojenize edilmesiyle hazırlanmıştır. Üçlü elektrot sistemi ile yapılan amperometrik ölçümlerde standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Lakkaz temelli biyosensörün çalışma koşulları ve immobilizasyon koşulları gibi deneysel değişkenler optimize edildi. Optimum immobilizasyon koşullarına göre hazırlanan biyosensörün karakterizasyonu ve gerçek numunelerin toplam fenolik içeriklerinin belirlenmesinde kullanılabilirliği araştırıldı. Deneysel sonuçlara göre lakkaz temelli biyosensör için reaksiyon koşulları, 50 mM derişimli fosfat tamponu (pH 6,0) ve 40ºC; biyosensörün biyoaktif tabakası için immobilize edilen enzim miktarı 1,25 U/5,0 µL; jelatin miktarı 2,0 mg olarak optimize edildi. Geliştirilen biyosensörün karakterizasyon çalışmaları sonucunda, gallik asit için doğrusal tayin aralığı 0,5-100 µM, cevap süresi 50-100 saniye ve tayin sınırı (LOD) 0,1323 µM olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik çalışmalarında (n=10) 20 µM gallik asit

derişiminde ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (±S.S.) ve varyasyon katsayısı (% V.K.), 20,83544 ±0,774916 µM ve % 3,7 olarak hesaplandı. Oda koşullarında depolanan biyosensör, 10 günün sonunda immobilize enzim aktivitesinin % 86'sını korumuştur. Geleneksel yöntemlerle elde edilen üzüm fermente içeceklerden hardaliye ve şarap örneklerinde toplam fenolik madde tayini için geliştirilen biyosensörün performansı değerlendirilmiştir. Eşdeğer gallik asit miktarına göre biyosensör tarafından ölçülen toplam fenolik madde miktarı, likid kromatografi-kütle/kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yönteminden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca hardaliye ve şarabın içeriğinde bulunan bazı maddelerin biyosensör cevabına girişim etkileri araştırılmıştır. Lakkaz temelli biyosensör sonuçları, LC-MS/MS kullanılarak yapılan analiz sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, hardaliye ve şarap için sırasıyla % 100,44 ve % 97,2 korelasyon gösterdiği hesaplanmıştır.

Yıl : 2021
Sayfa Sayısı : 112
Anahtar Kelimeler : Fenolik bileşik, Amperometrik biyosensör, Enzim biyosensörü, Lakkaz, Hardaliye

Master Thesis
Development of a Laccase Based Amperometric Biosensor for the Determination of Phenolic Compounds and Its Use in Food Analysis
Trakya University, Institute of Natural Sciences
Department of Applied Science and Technology

ABSTRACT

The determination of phenolic compound contents is of the great importance to characterizing foods and finding out the potential human health effects. Traditional techniques for phenolic compound analysis in foods are costly and require time-consuming sample preparation steps. Nowadays, the biosensors, as an alternative to such conventional techniques, enable to reliable, cost-effective, practical and on-site analyses for phenolic compounds.

In this thesis, the development of a simple and easy-to-handle laccase based amperometric biosensor for the determination of total phenolic compound was aimed. For this purpose, commercial *Trametes versicolor* laccase was immobilized to gelatin by the entrapment method. Carbon paste electrode was prepared by homogenized of immobilized enzyme with graphite powder and mineral oil. Gallic acid was used as the standard phenolic compound for the amperometric measurements performed with the triple electrode system. Experimental variables such as operating conditions and immobilization conditions of the laccase based biosensor were optimized. The characterization of the biosensor prepared according to the optimum immobilization conditions and its utility for the determination of total phenolic contents of real samples were investigated. According to the experimental results, the reaction conditions for the laccase based biosensor were 50 mM of phosphate buffer (pH 6.0) and 40ºC; for the bioactive layer of the biosensor, the amounts of immobilized enzyme and gelatin were optimized as 1.25 U/5.0 µL and as 2.0 mg, respectively. As a result of the characterization studies of the developed biosensor, the linear detection range for gallic

acid was determined as 0.5-100 μM, the response time as 50-100 seconds and the detection limit (LOD) as 0.1323 μM. In the reproducibility studies (n=10), the mean value ($\bar{x}$), standard deviation (±S.S.) and coefficient of variation (%V.K.) at 20 μM gallic acid concentration were calculated as 20.83544 ±0.774916 μM and, 3.7% respectively. The biosensor storaged at room conditions maintained 86% of the immobilized enzyme activity at the end of the 10 days. The performance of the developed biosensor was evaluated for the determination of total phenolic compounds in hardaliye and wine samples which are grape fermented beverages obtained by traditional methods. The total amount of phenolic substance measured by the biosensor according to the equivalent amount of gallic acid were compared with the results obtained from the liquid chromatography-mass/mass spectrometry (LC-MS/MS) method. In addition, the interference effects of some substances in the content of hardaliye and wine on the biosensor response were investigated. The results of laccase based biosensor correlated that 100.44% and 97.2% for hardaliye and wine, respectively, compared with the results of the analysis using LC-MS/MS.

Year : 2021

Number of Pages : 112

Keywords : Phenolic compound, Amperometric biosensor, Enzyme biosensor, Laccase, Hardaliye

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında, yardım ve tecrübelerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Didem TUNCAY'a, gerekli ekipman ve kimyasalları temin ederek Biyokimya Araştırma Laboratuvarını kullanmamı sağlayan, ayrıca bilgi ve tecrübeleri ile çalışmama katkıda bulunan Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hülya YAĞAR ve değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR, Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Engin ASAV ve Biyokimya Yüksek Lisans öğrencisi Dilek Nur ALTAY'a, LC-MS/MS analizlerinin gerçekleştirilmesinde çalışmama destek olan TÜTAGEM'e, kullandığımız hardaliye ve şarabı geleneksel yöntemlerle hazırlayarak kullanmamıza izin veren Ferudun UZUN'a ve tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından TÜBAP 2019/236 no'lu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xv**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xvii**
BÖLÜM 1 ..... **1**
GİRİŞ **1**
BÖLÜM 2 ..... **5**
KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**
2.1. Fenolik Bileşikler 5
2.1.1. Flavonoidler 6
2.1.1.1. Antosiyaninler 8
2.1.1.2. Antoksantinler 8
2.1.2. Fenolik Asitler 10
2.1.2.1. Hidroksibenzoik Asit 11
2.1.2.2. Hidroksisinamik Asit 11
2.1.3. Tanenler 12
2.1.3.1. Hidrolize Olabilen Tanenler 13
2.1.3.2. Kondense Tanenler 13
2.2. Gıdalarda Fenolik Bileşiklerin Önemi ve Tayin Yöntemleri 13
2.3. Biyosensörler 14
2.3.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması 16
2.4. Enzim Biyosensörleri 17
2.5. Enzim Biyosensörleri için Enzim İmmobilizasyonu 17

2.5.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri 17
2.5.1.1. Kovalent Bağlama 18
2.5.1.2. Adsorpsiyon 18
2.5.1.3. Çapraz Bağlama 19
2.5.1.4. Mikrokapsülleme 19
2.5.1.5. Tutuklama 19
2.6. Lakkazlar 20
2.7. Enzim Biyosensörlerinin Sınıflandırılması 24
2.7.1. Elektrokimyasal Temelli Enzim Biyosensörleri 25
2.7.1.1. Amperometrik Temelli Enzim Biyosensörleri 25
2.7.1.2. Potansiyometrik Temelli Enzim Biyosensörleri 26
2.7.1.3. Yarı İletken Temelli Enzim Biyosensörleri 26
2.7.2. Optik Temelli Enzim Biyosensörleri 27
2.7.3. Piezoelektrik Temelli Enzim Biyosensörleri 27
2.7.4. Kalorimetrik Temelli Enzim Biyosensörleri 27
2.8. Biyosensörün Performans Faktörleri 28
2.9. Gıdalarda Fenolik Bileşik Tayini ile ilgili Biyosensör Çalışmaları 29
2.10. Fenolik Madde Tayini Amaçlı Geliştirilen Biyosensör için Kullanılan Materyallere Genel Bakış 36
2.10.1. Karbon Pasta Elektrotlar 36
2.10.2. Jelatin 37
2.11. Üzüm ve Üzüm Ürünleri 38
2.11.1. Üzüm 38
2.11.2. Hardaliye 39
2.11.3. Şarap 40
BÖLÜM 3 42
MATERYAL ve YÖNTEM 42
3.1. Materyal 42
3.1.1. Kullanılan Cihazlar 42
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar 42
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler 43
3.1.3.1. Tampon Çözeltileri 43

3.1.3.2. Enzim Çözeltisi 43
3.1.3.3. Substrat Çözeltisi 43
3.1.3.4. Girişime Neden Olabilecek Maddelerin Çözeltileri 43
3.2. Yöntem 44
3.2.1. Çalışma Elektrodunun Temizlenmesi 44
3.2.2. Lakkaz Temelli Biyosensörün Hazırlanması 44
3.2.3. Lakkaz Temelli Biyosensörün Ölçüm Prosedürü 45
3.3. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu 46
3.3.1. pH Optimizasyonu 46
3.3.2. Sıcaklık Optimizasyonu 46
3.4. Lakkaz Temelli Biyosensör için İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi 47
3.4.1. Enzim Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi 47
3.4.2. Jelatin Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi 47
3.5. Biyosensör için Karakterizasyon Çalışmaları 47
3.5.1. Lakkaz Temelli Biyosensörün Döngüsel Voltamogramı 47
3.5.2. Gallik Asit için Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi 48
3.5.3. Lakkaz Temelli Biyosensörün Cevap Süresinin Belirlenmesi 48
3.5.4. Lakkaz Temelli Biyosensörün Tayin Sınırının (LOD) Belirlenmesi 48
3.5.5. Lakkaz Temelli Biyosensör için Tekrarlanabilirlik Çalışması 49
3.5.6. Lakkaz Temelli Biyosensör için Girişime Neden Olabilecek Maddelerin Etkisinin Belirlenmesi 49
3.5.7. Lakkaz Temelli Biyosensörün Depo Kararlılığı 49
3.6. Gerçek Örnek Analizi 50
BÖLÜM 4 51
SONUÇ ve TARTIŞMA 51
4.1. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu 51
4.1.1. pH Optimizasyonu 51
4.1.2. Sıcaklık Optimizasyonu 53
4.2. Lakkaz Temelli Biyosensör için İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi 56
4.2.1. Enzim Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi 56
4.2.2. Jelatin Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi 58
4.3. Biyosensör için Karakterizasyon Çalışmaları 60

4.3.1. Lakkaz Temelli Biyosensörün Döngüsel Voltamogramı 60
4.3.2. Gallik Asit için Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi 61
4.3.3. Lakkaz Temelli Biyosensörün Cevap Süresinin Belirlenmesi 63
4.3.4. Lakkaz Temelli Biyosensör için Tekrarlanabilirlik Çalışması 64
4.3.5. Lakkaz Temelli Biyosensör için Girişime Neden Olabilecek Maddelerin Etkisinin Belirlenmesi 65
4.3.6. Lakkaz Temelli Biyosensörün Depo Kararlılığı 66
4.4. Gerçek Örnek Analizi 67
KAYNAKLAR 77
ÖZGEÇMİŞ 95

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	:	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
BOD	:	Biyolojik Oksijen İhtiyacı
CV	:	Dönüşümlü Voltametri
Da	:	Dalton
dk	:	Dakika
EPR	:	Elektronik Paramanyetik Rezonans
GC	:	Gaz Kromatografisi
GC/MS	:	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
GQDs	:	Grafen Kuantum Noktaları
HPLC	:	Yüksek Performanslı Likid Kromatografisi
IUPAC	:	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LC-MS/MS	:	Likid Kromatografi-Kütle/Kütle Spektrometresi
MAPLE	:	Matriks Destekli Darbeli Lazer Buharlaştırma
mg	:	Miligram
mM	:	Milimolar
MWCNT	:	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
nA	:	Nanoamper
ng/mL	:	Nanogram/Mililitre
pI	:	İzoelektrik Nokta
ppm	:	Milyonda Bir Kısım
PVA	:	Polivinil Alkol
s	:	Saniye
sa	:	Saat
SWCNT	:	Tek Duvarlı Karbon Nanotüp
±S.S.	:	Standart Sapma
T1	:	Tip 1 Bakır

T2	:	Tip 2 Bakır
T3	:	Tip 3 Bakır
U	:	Unit
UV	:	Ultraviyole
V	:	Volt
% V.K.	:	% Varyasyon Katsayısı
$\bar{x}$	:	Ortalama Değer
µA	:	Mikroamper
µL	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Flavonoidlerin genel yapısı ve alt gruplarının temel yapıları……	7
Şekil 2.2.	Biyosensörün çalışma prensibi……..	15
Şekil 2.3.	Biyosensörde kullanılan yaygın immobilizasyon yöntemleri; (A) kovalent bağlama, (B) adsorpsiyon, (C) çapraz bağlama, (D) mikrokapsülleme ve (E) tutuklama ……..	18
Şekil 2.4.	*T. versicolor* lakkazı'nın 3 boyutlu modellenmiş yapısı….....	21
Şekil 2.5.	*T. versicolor* lakkazı'nın 3 boyutlu modellenmiş bakır koordinasyon merkezinin şematik gösterimi……..…...	22
Şekil 2.6.	(a) Substrat oksidasyonu için lakkaz katalizli redoks döngülerinin şeması; (b) hidrokinonun lakkaz ile oksidasyonu…….	23
Şekil 3.1.	Lakkaz temelli biyosensör ile yapılan amperometrik ölçümlerde kullanılan düzenek…….....	45
Şekil 3.2.	Üçlü elektrot sistemi……..	46
Şekil 4.1.	Biyosensör cevabına pH değerinin etkisi; reaksiyon ortamındaki gallik asit çözeltileri (2,5 µM) için 25°C'de, +0,7 V'da alınan amperometrik ölçümlere göre hesaplanan değerler……...	52
Şekil 4.2.	Biyosensör cevabına sıcaklık değerinin etkisi; 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) içeren reaksiyon ortamına eklenen gallik asit çözeltileri (2,5 µM) için +0,7 V'da alınan amperometrik ölçümlere göre hesaplanan değerler……...	54
Şekil 4.3. (a)	Biyoaktif tabakadaki immobilize lakkaz miktarının biyosensör cevabına etkisine ait kalibrasyon grafiği……...	56
Şekil 4.3. (b)	Biyoaktif tabakadaki immobilize lakkaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi; 1,25 U/5,0 µL lakkaz kullanılarak hazırlanan biyosensörün 5-100 µM çalışma aralığındaki değişen gallik asit derişimlerine karşı +0,7 V'da verdiği cevaplar…….	57

Şekil 4.4. (a) Biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisine ait kalibrasyon grafiği…….. 59

Şekil 4.4. (b) Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi: 2,0 mg jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörün 5-100 µM çalışma aralığında değişen gallik asit derişimlerine karşı +0,7 V'da verdiği cevaplar……. 59

Şekil 4.5. Lakkaz temelli biyosensör için gallik asit eklenmesi öncesi (baseline) ve sonrasında elde edilen döngüsel voltamogramlar: Ölçümler, 50 mM pH 6,0 fosfat tamponu çözeltisinde, 0,05 V/s tarama hızında, ±0,1 V potansiyel aralığında gerçekleştirildi…….. 61

Şekil 4.6. (a) Lakkaz temelli biyosensörün kalibrasyon grafiği: 0,5-100 µM aralığında gallik asit derişimleri için 50 mM fosfat tamponu, pH 6,0; 40°C reaksiyon koşullarında +0,7 V'da amperometrik ölçümler gerçekleştirildi…… 62

Şekil 4.6. (b) Lakkaz temelli biyosensörün 0,5-100 µM aralığında gallik asit derişimleri için 50 mM fosfat tamponu, pH 6,0; 40°C reaksiyon koşullarında +0,7 V'da verdiği cevaplar……..... 63

Şekil 4.7. Lakkaz temelli biyosensör için depo kararlılığı çalışması: Ölçümler, reaksiyon ortamında 10 µM gallik asit için 50 mM fosfat tamponunda (pH 6,0), 40°C sıcaklıkta, +0,7 V sabit potansiyelde amperometrik olarak gerçekleştirildi……... 67

Şekil 4.8. Ev yapımı hardaliye için LC-MS/MS kromatogramı…… 68

Şekil 4.9. Ev yapımı şarap için LC-MS/MS kromatogramı…….. 69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin temel sınıfları……..... 6

Çizelge 2.2. Fenolik asit gruplarının kimyasal yapıları……... 11

Çizelge 2.3. Biyosensör çeşitleri ve analiz kapsamları……... 16

Çizelge 4.1. Lakkaz immobilizasyonunda tutuklama ajanı olarak kullanılan jelatin matriksinin kararlılığının belirlenmesi için, biyosensör ile optimum çalışma koşullarında (50 mM fosfat tamponu, pH 6,0; 40°C) art arda gerçekleştirilen amperometrik ölçüm sonuçları……... 55

Çizelge 4.2. Optimum çalışma koşullarında (50 mM fosfat tamponu, pH 6,0; 40°C) gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları……. 65

Çizelge 4.3. Girişime neden olabilecek maddelerin biyosensör cevabına etkileri.. 66

Çizelge 4.4. Ev yapımı hardaliyedeki toplam fenolik bileşik miktarı……. 68

Çizelge 4.5. Ev yapımı şaraptaki toplam fenolik bileşik miktarı…… 69

Çizelge 4.6. Lakkaz temelli biyosensör kullanılarak elde edilen gallik asitin mililitresinde miligram olarak ifade edilen toplam fenolik madde içeriği ve LC-MS/MS metodu uygulaması ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması……... 70

Çizelge 4.7. Toplam fenolik madde tayini için geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün literatürdeki diğer biyosensör sistemleriyle karşılaştırılması……... 71

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Fenolik bileşikler meyve, sebze, tahıl ve çeşitli bitkisel ürünlerin sekonder metabolitleri olup bitkilerin savunma mekanizmasında görev almaktadırlar. Gıdaların renk, tat ve koku gibi çeşitli karakteristiklerini belirleyen fenolik bileşikler, aynı zamanda gıdalar için saflık kontrol kriteri olarak değerlendirilmektedirler. İnsan sağlığı üzerinde biyolojik olarak aktif etki göstermeleri onları gıdalardaki en popüler bileşik grubu haline getirmiştir. Fenolik bileşiklerin, antioksidatif, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antiviral etkilere sahip olduğunu bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Kulys & Bratkovskaja, 2007).

Gıdaların karakterizasyonu ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi açısından fenolik maddelerin tayini önem kazanmış ve günümüze kadar farklı teknikler geliştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan en yaygın teknikler, yüksek basınçlı likid kromatografisi ve gaz kromatografisi (Revilla, Garcia Beneytez, Cabello, Martin Ortega & Ryan, 2001; Rodriguez-Delgado, Malovana, Perez, Borges & Garcia-Montelongo, 2001) gibi kromatografik yöntemler ile kolorimetrik indirgenme reaksiyonlarının izlenmesi temelli spektrofotometrik yöntemlerdir. Ancak bu yöntemler, karmaşık ve zaman alıcıdır (Gomes, Nogueira & Rebelol, 2004; Shleev vd., 2005).

Biyosensörler ile yapılan analizler, örnek hazırlama ve üretim basamaklarının basit olması, hızlı ve yerinde ölçümler yapılabilmesi, ölçümlerde hassas ve tekrarlanabilir sonuçlara ulaşılabilmesi gibi birçok nedenden dolayı kromatografik ve spektrofotometrik tekniklere göre oldukça avantajlıdırlar. Biyosensörler, biyolojik bir element (biyoreseptör) ve bir dönüştürücüden (transduser) oluşan cihazlardır. Analit tespiti için kullanılan bu cihazlar, klinikten çevresel ve tarımsal uygulamalara kadar

geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Ayrıca, gıda endüstrisinde de kullanılmaktadır. Günümüzde, analitik amaçlar için yeni biyosensörlerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar hız kesmeden devam etmektedir. Geliştirilmelerinde kullanılan biyoreseptöre bağlı olarak, enzim biyosensörleri, immünosensörler, DNA biyosensörleri, termal ve piezoelektrik biyosensörler olmak üzere sınıflandırılmaktadırlar (Gomes vd., 2004).

Enzim biyosensörlerinin kullanımı, spesifik ve kendine özgü özelliklerinden dolayı zamanla artmıştır. Enzimler, canlı organizmalarda gerçekleşen tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörlerdir. Elektrokimyasal biyosensörlerin çalışma prensibi, enzimatik kataliz sonucu elektron üretimine dayanmaktadır. Hedef analit, elektrodun aktif yüzeyindeki kataliz reaksiyonunda kimyasal değişime uğrar ve reaksiyon sonucu üretilen iyonlar, ölçülebilir bir sinyal vermek için referans elektrodunkinden çıkarılan bir potansiyel yaratır. Dedektör sistemi tarafından ölçülecek özelliğe bağlı olarak, amperometrik, voltametrik, potansiyometrik, yarı iletkenlik ölçümler gerçekleştirilebilmektedir. Amperometrik ölçümler, gerçek zamanlı algılama imkânı sunmakta ve seri üretim için kolaylık sağlamaktadır (Campana vd., 2019). Amperometrik ölçüm yapan bir elektrot (transdüksiyon) ile bir oksidoredüktaz enzimi kombinasyonu, en çok çalışılan enzimatik elektrot konseptidir (Yashas, Shivakumara, Udayashankara & Krishna, 2018).

Literatürde, oksidoredüktaz ailesinden tirozinaz ve yaban turpu peroksidaz gibi enzimler kullanılarak geliştirilen çeşitli biyosensör çalışmaları bulunmaktadır. Ancak bu iki enzim, stabilite düşüklüğü, reaksiyon ürünleri tarafından inhibe edilebilme, katalitik işlevini tamamlamak için hidrojen peroksitin varlığına ihtiyaç duyma gibi çeşitli dezavantajlar barındırmaktadır. Diğer bir oksidoredüktaz ailesi enzimi olan lakkazlar ise ek kofaktörlere ihtiyaç duymadan elektron transfer reaksiyonlarını katalize etme, iyi stabilite gösterme, moleküler oksijen varlığında fenolleri ve *o*-, *m*-, *p*-benzendiol bileşiklerini oksitleme yetenekleri nedeniyle, biyosensör geliştirilmesinde spesifik avantajlar sağlayan enzim grubudur (Rodriguez-Delgado vd., 2015).

Lakkazlar (*p*-difenol: oksijen oksidoredüktaz, E.C: 1.10.3.2), mavi multi-bakır-oksidaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzimler, çeşitli fenolik ve fenolik olmayan aromatik hidrokarbonları oksitlemek için çok yönlülüğü nedeniyle uzun süredir araştırma tercihi olmuştur. Bakteri, mantar, bitki ve böcekler gibi çeşitli biyotik türlerden hücre dışı

enzimler olarak ekstrakte edilmektedirler. Literatürde, yaygın ticari lakkaz kaynaklarının *Trametes versicolor, Rhus vernicifera, Aspergillus oryzae, Cerrena unicolor, Coriolus hirsutus, Pleurotus ostreatus* olduğu bildirilmiştir. Lakkazlar, *o-, m- ve p*-benzendiollerin ve fenolün *o-, m-, p*-kinonlara veya radikal türlere oksidasyonunu herhangi bir ko-substrat ya da kofaktöre ihtiyaç duymadan katalizleyebilmektedirler. Reaksiyon sırasında serbest oksijen kullanırlar ve açığa çıkan ürün sudur.

Lakkaz temelli biyosensörler, elektrot ve enzim arasında medyatör gerekmeksizin doğrudan elektron transferinin gerçekleştiği üçüncü nesil biyosensörlerdir. Girişime neden olabilecek maddelerin yokluğunda, yüksek seçicilik ve hassasiyette cevaplar vermektedirler. Tüm bu özellikler, lakkazların başta fenolik madde tayini için olmak üzere biyosensör geliştirme proseslerinde sıklıkla kullanılan bir enzim grubu olmasını sağlamaktadır (Mousty, Vieille & Cosnier, 2007; Shleev vd., 2005).

Üzüm, dünyada en çok tüketilen, yaklaşık % 75'i çekirdek ve kabuklarında olmak üzere fenolik bileşikler bakımından oldukça zengin meyvelerden biridir. Antosiyaninler, flavan-3-ollar, flavanollar, stilbenler, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinamik asit üzüm için tanımlanan en önemli fenolik bileşik gruplarıdır. Özellikle yapısında bulunan antosiyaninler nedeniyle güçlü antiinflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler. Günümüzde tüketicilerin, gıdaların niteliklerini ve sağlık üzerindeki etkilerini sorgulamaya başlamaları nedeniyle, fenolik madde içeriği yüksek olan gıda ürünlerine olan ilgi artmıştır. Hardaliye de bunlardan biridir. Trakya Bölgesi başta olmak üzere geçmişten günümüze geleneksel yöntemlerle üzümden elde edilen hardaliye, alkolik olmayan fermente bir içecektir. Ticari ürün olarak raflarda daha sık görmeye başladığımız bu içecekle ile ilgili literatür çalışmalarının sayısı da yaygın tüketimiyle birlikte artmaktadır (Aydoğdu, Yıldırım, Halkman & Durgun, 2014).

Bu tez çalışmasında, gıda analizlerinde fenolik madde tayininin hızlı ve pratik bir şekilde gerçekleştirilmesi için lakkaz temelli amperometrik bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Biyosensör için çalışma ve immobilizasyon koşulları optimize edildi ve ardından karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Biyosensörün örneklerde uygulanabilirliğini belirlemek için, günümüzde popülerliği artan geleneksel ev yapımı

fermente içeceklerden “Hardaliye” model alınarak yapısındaki toplam fenolik madde tayini gerçekleştirildi. Geliştirilen biyosensör, hardaliye ile aynı üzümden elde edilen ev yapımı şarap gibi farklı bir ürünün de fenolik madde içeriğinin ölçümünde kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, fenolik madde tayini için kabul gören likid kromatografi-kütle/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi ile karşılaştırıldı.

BÖLÜM 2

KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler veya polifenoller, bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan ve yapılarında, bir veya birden fazla aromatik halka ve bu halka/halkalara bağlı en az bir hidroksil grubu içeren organik bileşiklerdir. Bitkilerin ikincil metabolizmasının ürünleri olan ve çeşitlilik gösteren bu bileşikler, çoğunlukla hücrede hidroksil gruplarından özellikle şeker türlerine (en sık olarak glukoz) bağlanmış formda bulunmaktadırlar. Fenolik bileşiklerin, bitkilerin büyümesini düzenleme, bitkileri zararlı UV ışınları, zararlı organizmalar ve oluşabilecek enfeksiyonlardan koruma, böcekleri çekerek tozlaşmayı sağlama gibi birçok önemli fizyolojik görevi bulunmaktadır (Dorman, Peltoketo, Hiltunen & Tikkanen, 2003).

Fenolik bileşiklerin, birçok meyve, sebze ve onlardan elde edilen gıda ürünlerinin organoleptik (tat, koku vb.) özelliklerinden sorumlu oldukları bilinmektedir (Gamella, Campuzano, Reviejo & Pingarron, 2006; Torrecilla, Mena, Yanez-Sedeno & Garcia, 2007). Ayrıca, insan sağlığı üzerindeki koruyucu etkilerinin çoğu, antioksidan, antimutajenik, antikanserojenik, antiinflamatuar, antimikrobiyal ve diğer biyolojik özelliklerine atfedilmiştir (Xu, Ye, Liu, Ma & Chen, 2008). Meyvelerin, otların, sebzelerin, tahılların ve diğer bitki materyallerinin fenolik bakımından zengin ham özlerinin biyolojik aktivitesinin gıdaların kalitesini ve besin değerini iyileştirdiğinin ortaya konulmasıyla birlikte bu bileşiklere olan ilgi gıda sektörü için de giderek artmıştır (Kahkönen vd., 1999; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Fenolik bileşiklerin üç önemli grubu, fenolik asitler, flavonoidler ve tanenlerdir (Ge, Li & Lisak, 2020). Çizelge 2.1'de bitkilerdeki fenolik bileşiklerin temel sınıfları karbon iskeletlerine göre sınıflandırılmıştır.

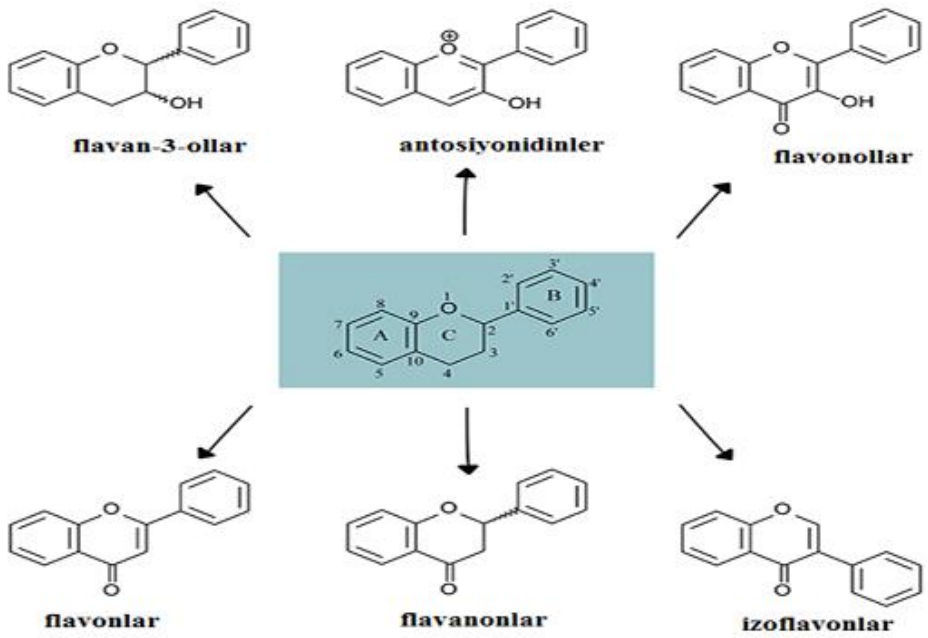
Çizelge 2.1. Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin temel sınıfları (Urquiaga & Leighton, 2000)

Basit Formüller	Sınıf	Örnekler
C_6	Basit fenoller Benzokinonlar	Kateşol, Hidrokinon 2,6-Dimetoksibenzokinon
C_6-C_1	Fenolik asitler	Gallik asit, Salisilik asit
C_6-C_2	Asetofenon Tirozin türevleri Fenilasetik asitler	3-Asetil-6-metoksibenzaldehit Tirozol *p*-Hidroksifenilasetik
C_6-C_3	Hidroksisinnamik asitler Fenilpropenler Kumarinler İzokumarinler Kromonlar	Kafeik, Ferulik Miristisin, Eugenol Umbelliferon, Aeskuletin Eugenin
C_6-C_4	Naftokinonlar	Juglon, Plumbagin
C_6-C_1-C_6	Ksantonlar	Mangiferin
C_6-C_2-C_6	Stilbenler Antrakinonlar	Resveratrol Emodin
C_6-C_3-C_6	Flavonoidler İzoflavonlar	Kuersetin, Siyanidin Genistein
$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanlar Neolignanlar	Pinoresinol Eusiderin
$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoidler	Amentoflavon
$(C_6$-$C_3)_n$ $(C_6)_n$ $(C_6$-C_3-$C_6)_n$	Ligninler Kateşol melaninler Flavolanlar (Kondense tanenler)	

2.1.1. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin en geniş grubudur. Günümüze kadar bitkisel dokularda 6000'den fazla flavonoid yapılı bileşik tanımlanmıştır. Pek çok meyve ve sebzenin yanı sıra kırmızı şarap, çay, soğan, elma ve soya gibi çeşitli ürünlerde bulunan flavonoid yapılı bileşik miktarı oldukça yüksektir

(Zand, Jenkins & Diamandis, 2002). Flavonoidler, genel olarak, oksijen içeren bir heterosiklik halkaya bağlı iki fenil halkasından oluşan 15 karbonlu (C_6-C_3-C_6) iskelet yapısına sahiptirler. Şekil 2.1'de A ve B aromatik halkaları, C ise hetero halkayı göstermektedir. A ve C halkalarında karbon atomlarının numaralandırılması, oksijen atomundan başlayarak yapılmaktadır. B halkasının içerdiği atomlar, (rakam)′ şeklinde numaralandırılmaktadır. Flavonoidlerin yapı çeşitliliği, A ve B aromatik halkalarına bağlı metil, hidroksil, mono-, di- ve trisakkarit gibi ornatıkların türü, sayıları ve bağlanma pozisyonları ile belirlenmektedir. Flavonoidler, antosiyaninler ve antoksantinler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Şekil 2.1'de flavonoidlerin genel yapısı ve alt gruplarının temel yapıları gösterilmektedir. Antosiyaninler, antosiyonidin yapıların şeker molekülleri ile bağ yapması sonucu oluşan kırmızı, mavi ve mor gibi bazı renk pigmentlerine sahip moleküllerdir. Antoksantinler ise renksiz veya renkleri beyazdan sarıya değişen pigmentler olup beş grupta incelenirler. Bunlar flavonlar, flavonollar, flavanonlar, flavan-3-ollar ve izoflavonlardır (King & Young, 1999).



Şekil 2.1. Flavonoidlerin genel yapısı ve alt gruplarının temel yapıları (Fraga, 2010)

2.1.1.1. Antosiyaninler

Flavonoid pigmentlerinin en önemli grubu olan antosiyaninler, antosiyonidin yapısının şeker molekülleri ile bağ yapması sonucu oluşan glikozit yapılı, suda çözünebilen bileşiklerdir. Gelişmiş bitkilerin kırmızı, mavi ve mor renklerinden sorumlu olan antosiyaninler, meyve ve çiçek dokuları başta olmak üzere bitkilerin yaprak, gövde ve köklerinde de sentezlenmektedirler. Antosiyaninler, şeker çeşitliliği ve C halkasında şeker molekülünün bağlandığı yere göre (C3; C3-C5 veya C3-C7) mono-glikozitler ve di-glikozitler şeklinde sınıflandırılabilmektedirler (Şekil 2.1). Bitkilerin zor koşullara dayanmasında ve verdikleri parlak renkler sayesinde böcek ve diğer hayvanları çekerek polen yayılımında önemli rol oynamaktadırlar (Prior & Wu, 2006). Meyvelere, kendilerine özgü ve canlı renkleri sağlayan antosiyanin bileşiklerinden en yaygını siyanidin-3-glukozittir. Kızılcık, böğürtlen ve mürver sadece siyanidin türevlerini içerirken, yaban mersini ve siyah frenk üzümünün yapısındaki antosiyaninler çeşitlilik göstermektedir. Bununla birlikte, malvidin glikozitler de kırmızı üzüm çeşitleri ve ürünlerinde bulunan karakteristik antosiyanin yapılı bileşiklerdir. Yapılan çalışmalarda, bu bileşik grubunun antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuar özellikleri nedeniyle insan sağlığı için yararlı etkileri hakkında önemli bulgular tespit edilmiştir (Fraga, 2010; Prior & Wu, 2006).

2.1.1.2. Antoksantinler

Bitkilerde bulunan bir flavonoid türüdür. Renksiz veya renkleri beyazdan sarıya değişen suda çözünür pigmentlerdir. Bu pigmentler asidik ortamda beyaz, alkali ortamda sarı renklidirler. Soğan, şalgam, karnabahar, patates ve beyaz lahanada bulunurlar (Aydın, 2021; Dutta & Halder, 2021). Flavonlar, flavonollar, flavanonlar, flavan-3-ollar ve izoflavonlar olmak üzere beş grupta incelenirler.

- **Flavonlar:** Flavonlar, heterosiklik halkada (C4) bir karbonil grubu içeren antoksantin grubu bileşiklerdir (Şekil 2.1). Bitkilerde yaygın olarak bulunan flavon ve flavon glikozitleri açık sarı renklidir. Apigenin ve luteolin en önemli flavon örnekleridir. Kereviz, maydanoz, enginar ve zeytin, flavon içeriği yüksek olarak bildirilen gıdalardandır (Crozier, Ashihara & Clifford, 2006a).

- **Flavonollar:** Flavonollar, flavonoidlerin en yaygın türüdür. Flavonların C halkasındaki 3 numaralı karbona hidroksil grubunun eklenmesi, bir flavonol molekülünü oluşturmaktadır (Şekil 2.1) (Cowan, 1999). Kuersetin, kamferol ve mirisetin, doğada yaygın olarak bulunan üç flavonol türüdür. Soğan, elma, karalahana ve çay, flavonol seviyeleri yüksek bitkilere örnek olarak verilebilir (Çoban, 2008). Ayrıca, moringa, çilek, hint inciri, ıspanak ve karnabaharda da çeşitli flavonol yapılı bileşikler saptanmıştır (Sultana & Anwar, 2008).

- **Flavan-3-ollar:** Flavan-3-ollar yapısal olarak basit monomerlerden, (+)-kateşin ve izomeri (-)-epikateşin gibi oligomerik ve polimerik proantosiyanidinlere kadar değişkenlik gösteren en karmaşık flavonoid alt sınıfıdır. Kondense tanenler olarak da bilinmektedirler (Crozier, Jaganath & Clifford, 2006b). Gıdalardaki varlığı, burukluk, acılık, ekşilik, tatlılık, aroma ve renk oluşumu gibi kalite parametrelerini etkilemektedir (Aron & Kennedy, 2007). Kayısı, vişne, üzüm, böğürtlen gibi meyvelerde bol miktarda bulunmaktadırlar. Baklagil ve tahıllarda, çayda olduğu gibi gallik asit türevi olan tanenler ile kondense halde bulunmaktadırlar. Kırmızı şarap ve bira gibi flavan-3-ollar açısından zengin içeceklere örnek olarak verilebilir. Ayrıca, işlenmiş gıdalarda, bitkisel ilaç ve takviye ürünlerde fonksiyonel bileşenler olarak kabul edilmektedirler (Fraga, 2010).

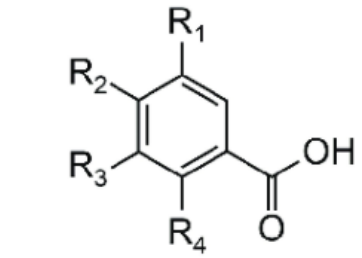
- **İzoflavonlar:** İzoflavonlar, Şekil 2.1'de görüldüğü gibi diğer flavonoidlerin aksine B-halkasının C2 pozisyonundan ziyade C3'e bağlanmasıyla karakterize edilmektedir. Bitki aleminde çok sınırlı bir dağılıma sahiptirler ve özellikle soya fasulyesi olmak üzere baklagil ailesine özgü fenolik bileşik grubudurlar. En bilinen izoflavonlar, genistein ve daidzein'dir. Bitkilerde izoflavonlar ağırlıklı olarak β-glukozitler (genistein, daidzein, glisitin), asetil-β-glukozitler veya malonil-β-glukozitler olarak bulunmaktadırlar ve bu nedenle suda çözünür bileşiklerdir. İzoflavonlar ayrıca metilasyon, hidroksilasyon veya polimerizasyon gibi çeşitli modifikasyonlara uğrayarak izoflavanon, izoflavan ve izoflavan-3-ol gibi basit izoflavonların yanı sıra rotenoidler, glisinoller ve coumestanlar gibi daha karmaşık yapıları oluşturmaktadır (Çoban, 2008; Fraga, 2010).

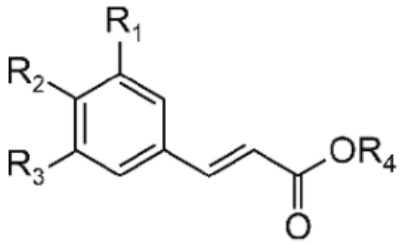
2.1.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, bitkiler aleminin en basit fenolik bileşik grubudur. Bitkilerde glikozitlerin veya organik asitlerin esterleri formunda protein ya da hücre duvarının polimerlerine bağlı durumdadırlar. Sadece küçük kısmı doğada serbest olarak bulunmaktadır. Fenolik asitlerin gıdalardaki varlığı, besinlerin kararlılığını, besin değerini, renk, koku ve kalitesini belirgin olarak etkilemektedir. Fenolik asit içeren birçok bitki vasküler, viral, gastrointestinal, mikrobiyal ve inflamatuar hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Robbins, 2003). Üzüm çekirdeği, üzüm kabuğu (Yılmaz & Toledo, 2004), buğday kepeği (Ferguson & Haris, 1999; Yu & Zhou, 2005), greyfurt gibi narenciye türleri (Gorinstein vd., 2004a), adaçayı (Bozan, Öztürk, Tunalier, Koşar & Başer, 2002), ballıbabagiller familyasından sideritis (Tunalier vd., 2004) ve bazı baharatlar (tarçın, kimyon, karabiber vb.) (Bozan, Koşar, Tunalier, Öztürk & Başer, 2003), şarap (Minussi vd., 2003), zeytinyağı (Morozzi, Servili, Selvaggini, Esposto & Taticchi, 2004; Owen vd., 2000) gibi bitkisel ürünlerin içerdikleri fenolik asitlerden kaynaklanan antioksidan aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Ferguson & Haris, 1999; Gorinstein vd., 2004b; Minussi vd., 2003; Morozzi vd., 2004; Owen vd., 2000; Yu & Zhou, 2005).

Fenolik asitler, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinamik asit türevleri olarak iki sınıfta incelenmektedir (Ho, 1991). Çizelge 2.2'de kimyasal yapıları verilen gallik asit, prokateşik asit, vanilik asit, *p*-hidroksibenzoik asit ve şiringik asit hidroksibenzoik türevli; *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit ise hidroksisinamik asit türevli gruba aittirler (Cadenas & Packer, 2002; Lodovici, Guglielmi, Meoni & Dolara, 2001; Minussi vd., 2003). Yapılan çeşitli antioksidan aktivite çalışmalarında, hidroksisinamik asit türevlerinin hidroksibenzoik asit türevlerinden daha etkili olduğu ortaya konmuştur (Marinova & Yanishlieva, 2003).

Çizelge 2.2. Fenolik asit gruplarının kimyasal yapıları (Fraga, 2010; Jackson, 2000)





Hidroksibenzoik Asit Türevleri	**R_1**	**R_2**	**R_3**	**R_4**
Gallik asit	H	OH	OH	OH
Protokateşik asit	H	OH	OH	H
Vanilik asit	H	OCH_3	OH	H
p-hidroksibenzoik asit	H	H	OH	H
Şiringik asit	H	OCH_3	OH	OCH_3
Hidroksisinamik Asit Türevleri	**R_1**	**R_2**	**R_3**	**R_4**
p-kumarik asit	H	H	OH	H
o-kumarik asit	OH	H	H	H
Kafeik asit	OH	OH	H	H
Ferulik asit	OCH_3	OH	H	H
Sinapik asit	OCH_3	OH	OCH_3	H

2.1.2.1. Hidroksibenzoik Asit

Hidroksibenzoik asitler fenilpropan yapısındadırlar ve hidroksisinamik asit türevlerine göre bitkilerde daha az miktarda bulunurlar. Hidroksisinamik asitlerin oksidasyonu ile oluşan bu grup bileşikleri, soğan, yaban turpu gibi sebzeler, üzüm çilek, narenciye gibi meyveler ve sert kabuklu yemişlerde bulunmaktadır. Bitkilerde bağlı formda bulunan bu asitler, karmaşık yapılı lignin ve hidrolize olabilen tanenlerin bileşenleridir (Fraga, 2010). Hidroksibenzoik asit türevlerinin en önemlilerinden biri olan gallik asit veya 3,4,5-trihidroksibenzoik asit yeşil çay, üzüm, kırmızı şarap ve bira gibi gıdalarda bulunmaktadır. Lipid peroksidasyonun ve bozulmanın neden olduğu acılaşmayı önlemek için gıda, ilaç ve kozmetik gibi alanlarda kullanılmaktadırlar ve antioksidan, antimutajen, antikanserojen ve antiinflamatuar özelliklere sahiptirler (Crozier vd., 2006c; Tang, Covington & Hancock, 2003a; Tang, Covington & Hancock, 2003b).

2.1.2.2. Hidroksisinamik Asit

Hidrosisinamik asitler yapılarında bir fenilpropan halkası bulundurmaktadırlar. Bu halkaya bağlı hidroksil grubunun sayısına ve konumuna göre çeşitli alt grupları

bulunmaktadır. Hidrosisinamik asitlerin, antimikrobiyal, antikanserojen ve antidiyabetik etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (Fraga, 2010).

Hidroksisinamik asitler böğürtlen, meyve ve içeceklerde ve aynı zamanda birçok sebze ve tahıl türlerinde bulunmaktadır. Kafeik, *p*-kumarik, *o*-kumarik ve ferulik asitler, hidroksisinamik asitlerin örnekleridir. Sinamik ve kafeik asitler, yüksek oksidasyona sahip geniş bir fenilpropan türevli bileşik grubunun ortak temsilcileridir. Bu fenolik asit grupları, ısıya duyarlıdırlar. Yaygın otlardan tarhun ve kekiğin her ikisi de bakteri, mantar ve virüslere etkili olan kafeik asit içermektedir (Cowan, 1999).

Hidroksisinamik asitlerin doğada en çok bulunan türevi olan kafeik asit, elma, üzüm, erik gibi meyvelerin yapısında bulunmaktadır. Oda koşullarında sarı renkli kristalize formdadır. Çözünürlüğü, sıcak suda ve alkolde oldukça iyidir. Nitritin hızlı bir şekilde nitrik oksite indirgenmesinde rol almaktadırlar (Akkan, 2008).

Tahıllarda bol miktarda bulunan ferulik asit, fenilalanin ve tirozin metabolizmasından kaynaklanan bir fenoliktir. Bitkilerin birincil ve ikincil hücre duvarlarında bulunan polisakkaritlerle esterleştirilmektedir. Ferulik asit, monokotiledonların hücre duvarlarında meydana gelen ana fenolik asittir ve cis-trans izomerler olarak görünmektedir (Klepacka & Forna, 2006). Ferulik asit ester formunda buğday, mısır, çavdar, arpa, yulaf gibi tahıllarda, ıspanak, şeker pancarı ve su kestanelerinde bulunmaktadır. Nadiren arpada olduğu gibi serbest formda da bulunmaktadır (Clifford, 1999; Yu, Vasanthan & Temelli, 2001). Birincil hücre duvarlarında, ıspanak veya buğday kepeğinde olduğu gibi aleuron tabakasında ve perikarpta arabinoksilanlara esterleştirilmektedir (Fraga, 2010).

2.1.3. Tanenler

Bitkisel tanenler (bitki polifenolleri), şu anda bilinen 8000'den fazla fenolik yapı ile bitkiler aleminde en fazla çeşitlilik gösteren ve yaygın olarak bilinen kategorilerden biridir (Liao, Lu & Shi, 2003). Tanenler, moleküler ağırlığı 500 ila 3000 Da arasında olan suda çözünür fenolik bileşiklerdir. Bu fenolik bileşikler, çok sayıda hidroksil veya diğer fonksiyonel grupları içermektedir. Proteinler ve diğer makromoleküller ile çapraz bağlar oluşturmaktadırlar (Çoban, 2008). Bu fenolik grubu iki kategoride incelenmektedir: Hidrolize olabilen tanenler (gallik asit ve polisakkaritlerin

poliesterleri) ve kondense tanenler (flavan-3-ollar ve flavan-3,4-diollerin polimerize ürünleri veya ikisinin bir karışımı). Diğer tanen türleri de bu iki temel yapının bir kombinasyonu olarak görülmektedir (Liao vd., 2003).

2.1.3.1. Hidrolize Olabilen Tanenler

Hidrolize olabilen tanenler, kısmen veya tamamen gallik asit (gallotanninler) veya heksahidroksidifenik asit (ellajitanninler) ile esterlenen glukoz ve hidroksil grupları gibi bir merkezi polihidrik alkol çekirdeği içermektedir. Asitlerle, bazlarla veya belirli enzimlerle hidrolizden sonra, gallotanninler glukoz ve gallik asitler vermektedir. Ellajitanninlerin hekzahidroksidifenik asidi, elajik asit üretmek için laktonizasyona uğramaktadır (Çoban, 2008).

2.1.3.2. Kondense Tanenler

Kondense tanenler yapısal olarak hidrolize olabilen tanenlerden daha karmaşıktır. Tam yapıları henüz belirlenmemiştir. Esas olarak flavan-3-ollar ve flavan-3,4-diollerin polimerize edilmiş ürünleri veya ikisinin bir karışımıdır. "Flavolanlar" olarak adlandırılan polimerler, yaygın olarak kondense tanenler olarak adlandırılmaktadır. Kondense tanenler meyveler, sebzeler, yem bitkileri, bitkiler, kakao, kırmızı şarap ve sorgum, parmak darı ve baklagil gibi belirli gıda tahıllarında yaygın olarak bulunmaktadır (Çoban, 2008).

2.2. Gıdalarda Fenolik Bileşiklerin Önemi ve Tayin Yöntemleri

Bitkilerde çeşitli fizyolojik görevlerinin yanında tat, koku ve renk oluşumu üzerinde de etkileri olan fenolik bileşikler, gıda bileşeni olarak enzim inhibisyonuna sebep olmaları, antioksidan, antiviral ve antimikrobiyal özellikler göstermeleri nedeniyle insan sağlığı açısından önem taşımaktadırlar. Ayrıca, fenolik bileşikler, taze ve işlenmiş gıdaların duyusal ve besleyici kalitesi ile de yakından ilişkilidir (Macheix, Fleuriet & Billot, 1990). Gıdanın istenen ve istenmeyen aroma ve tatlarına doğrudan katkıda bulunan bu bileşikler ayrıca gıda maddelerinde esmerleşmeye neden olmakta ve onların piyasa değerini düşürmektedir. Üzüm ve patatesin kahverengileşme reaksiyonlarından oksijen varlığında polifenoloksidaz adlı enzimin sorumlu olduğu bildirilmiştir. Meyvelerdeki enzimatik esmerleşme reaksiyonu genellikle fenolik

içeriğin ve polifenoloksidaz aktivitesinin doğrusal bir fonksiyonu olarak kabul edilmiştir (Sapis, Macheix & Cordonnier, 1983). Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, fenolik bileşiklerin sebze ve meyvelerdeki suda çözünen antioksidanların en önemli grubunu oluşturmaları nedeniyle bu bileşenlere olan ilgi daha da artmıştır.

Doğal suların kirlenmesinden sorumlu olan toksik fenolik bileşiklerin sulardaki varlığı, tekstil, kömür, madencilik, kimya, petrokimya, ilaç kağıt, boya endüstrilerinin atık sularından ve ürünlerinden kaynaklanmaktadır (Decker vd., 2007; Karim & Fakhruddin, 2012). Canlı sağlığını tehdit eden toksik fenoliklerin sulardaki düşük derişimlerinin tayin edilebilmesi de bu anlamda önem kazanmıştır (Annachhatreve & Gheewala, 1996; Kulys & Bratkovskaja, 2007).

Üzüm, nar, mor havuç gibi meyve ve sebzeler ile bunlardan üretilen gıdalarda, doğal çevre sularında ve atık sularda, fenolik bileşik türevlerinin belirlenmesi için çeşitli analitik yöntemler önerilmiştir. En yaygın kullanılanlar gaz kromatografisi (GC) (Padilla-Sanchez vd., 2011), yüksek performanslı likid kromatografisi (HPLC) (Tanigawa, Watabe, Kubo & Hosoya, 2011), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC/MS), likid kromatografi-kütle/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) (Kelebek, Dıblan, Kadiroğlu, Kola & Selli, 2018) gibi kromatografik yöntemler; Folin-Ciocalteu yöntemi (Magalhaes, Segundo, Reis, Lima & Rangel, 2006) gibi spektrofotometrik yöntemler ve elektrokimyasal yöntemlerdir (Jing vd., 2011; Vidal vd., 2008).

Adı geçen yöntemler, düşük fenolik madde derişimlerinde doğru sonuçlar verseler de karmaşık ön işlem süreçleri ve zaman alıcı tespit yöntemleri nedeniyle kullanım alanları oldukça kısıtlıdır. Seçicilikten yoksun analizler yapabilmelerinin yanında oldukça maliyetli işlemlere ihtiyaç duymaktadırlar. Tüm bu dezavantajlar nedeniyle, araştırmacılar fenolik bileşik analizleri için biyosensör gibi basit, hassas, spesifik, doğru ve taşınabilir sistemler geliştirmeye odaklanmıştırlar (Sarika vd., 2017).

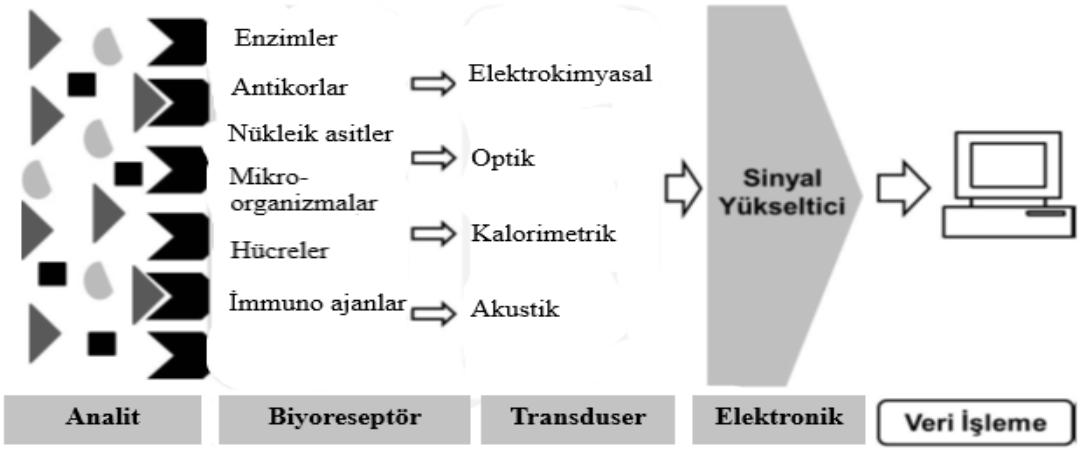
2.3. Biyosensörler

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) terminolojisine göre biyosensörler; kimyasal bileşikleri genellikle elektrik, termal veya optik sinyallerle belirlemek için enzimler,

antikorlar, dokular, organeller veya hücreler tarafından aracılık edilen özel biyokimyasal reaksiyonları kullanan bir cihazdır (McNaught & Wilkinson, 1997).

Biyosensörlerin başlangıcı, biyosensör kavramının babası olarak bilinen Leland C. Clark Jr.'ın, glukoz oksidazın bir oksijen elektroduna, diyaliz membranı kullanılarak tutuklanması ile ilgili deneyini yayınladığı 1962 yılı olarak tarihlendirilebilir. Böylece kandaki glukoz seviyesini ölçerek yeni bir analitik sistem oluşturmuşlardır. Bu yeni analitik cihaz, yüksek spesifikliğe sahip bir biyolojik sistem (enzim) ile elektrot gibi fiziksel bir sistemin tayin duyarlılığını birleştirmektedir (Clark Jr. & Lyons, 1962).

Biyosensör, biyoreseptör (biyobileşen) ve transduser (dönüştürücü) adlı iki ana bölümden oluşan bir cihazdır. Biyoreseptörler, biyosensörün hedef analiti ile etkileşen ve bu etkileşim sonucunda biyolojik reaksiyona girerek sinyal üreten biyolojik kısmıdır. Enzimler, doku örnekleri, organeller, nükleik asitler, immünoajanlar, mikroorganizmalar ve biyoreseptör molekülleri biyosensörlerde biyoreseptör olarak kullanılabilmektedir. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğrattığında üretilen kimyasal veya fiziksel sinyaller transduserler tarafından algılanır. Biyokimyasal reaksiyona göre transduser seçimi yapılmaktadır. Bu transduser sistemleri elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, kalorimetrik, manyetik temelli olabilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Biyosensörün çalışma prensibi (Telefoncu, 1999; Vargas-Bernal, Rodriguez-Miranda & Herrera-Perez, 2012)

Bir biyosensörün tasarımı için izlenecek adımlardan en önemlisi, biyobileşenin immobilize edilmesi aşamasıdır. Biyosensörlerin performansı, kimyasal ve fiziksel koşullar (pH, sıcaklık ve kirleticiler), biyoaktif tabakanın kalınlığı ve stabilitesi gibi faktörlere de bağlıdır (Kissinger, 2005; Mittal, Kaur, Gautam & Mantha, 2017).

Hedef analit hakkında hızlı, gerçek, doğru ve güvenilir bilgi sağlamaları, düşük maliyetli ve taşınabilir cihazlar olmaları nedeniyle biyosensörlerin kullanım alanları oldukça geniştir (Verma & Bhardwaj, 2015). Gıda işleme ve güvenliği (Huet vd., 2010), çevre analizleri, veterinerlik ve tarım uygulamaları (Hernandez-Vargas vd., 2018), biyoproses görüntüleme (Scheper, Hilmer, Lammers, Müller & Reinecke, 1996), ilaç geliştirme, hastalık teşhisi ve klinik analizlerde (Aydındoğan, Balaban, Evran, Coşkunol & Timur, 2019; Aydındoğan, Güler-Çelik & Timur, 2018; Balaban vd., 2020; Wang, 2006) kullanılmaktadır. Biyosensörlerin, yüksek spesifiteye sahip cevaplar vermeleri, renkli ve bulanık çözeltilerdeki analitlerin tayini için geniş derişim aralığında ölçüm yapabilmeleri gibi önemli avantajları vardır (Telefoncu, 1999).

2.3.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, kullanılan biyoreseptör türüne göre sınıflandırılabilmektedirler (Çizelge 2.3). Biyosensörler ile gerçekleştirilen analizler, gıda içerikleri, pestisit gibi toksik kimyasallar, çeşitli metabolitler, vitamin, antibiyotik, ilaç gibi organik maddeler ile bazı anorganik bileşikler dışında ayrıca virüs ve patojen mikroorganizma tayinlerini kapsayabilmektedir. Biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD), toksisite ve mutajenite analizleri de biyosensörlerin önemli uygulama alanlarındandır (Gökdoğan, 2011).

Çizelge 2.3. Biyosensör çeşitleri ve analiz kapsamları (Yarar, 2014)

Biyosensör Çeşitleri	Analiz Kapsamı
Enzim biyosensörleri	Gıda içerikleri, vitamin, metabolit, ilaç, antibiyotik ve pestisitler vb. düşük molekül ağırlıklı organik ve anorganik maddeler
Mikrobiyal biyosensörler	Enzim biyosensörlerinin kapsadığı analiz alanları, BOD, toksisite ve mutajenite analizleri
DNA biyosensörleri	Patojen mikroorganizmalar, virüsler
İmmunosensörler	Patojen mikroorganizmalar, virüsler, ksenobiyotikler

2.4. Enzim Biyosensörleri

Enzimler, substrata özgü reaksiyonları son derece hızlı katalize eden biyolojik katalizörlerdir. Analitik bir işlemde enzimler, substratlarının spesifik analizleri için kullanılabilmektedir. Enzim biyosensörleri, substratın hassas olarak tespiti için önemli bir amplifikasyon sistemi sağlamaktadır (Çoban, 2008). Enzim temelli biyosensörlerin çoğu, amperometrik transdüksiyon yöntemini kullanmaktadır (Pejcic & Marco, 2006). Enzimler, spesifite ve duyarlılıklarından dolayı oldukça önemli analitik ajanlardır. Ancak, enzim aktivitesinin ortam koşullarına bağlı olması, inhibisyon problemleri, enzim aktivitesine etki eden girişime neden olabilecek maddelerin varlığı, enzimin aktivitesini uzun süre koruma kapasitesi ile ilgili kısıtlamalar, enzim izolasyonu ve saflaştırma maliyetleri gibi güçlükler, enzimlerin analitik amaçlarla kullanımını sınırlandırmıştır. Günümüzde, enzimler için uygulanan immobilizasyon prosedürleri sayesinde enzimlerin kullanım kısıtlamaları azaltılmış olup, özellikleri iyileştirilmiş ve uygulama alanları genişletilmiştir (Yarar, 2014).

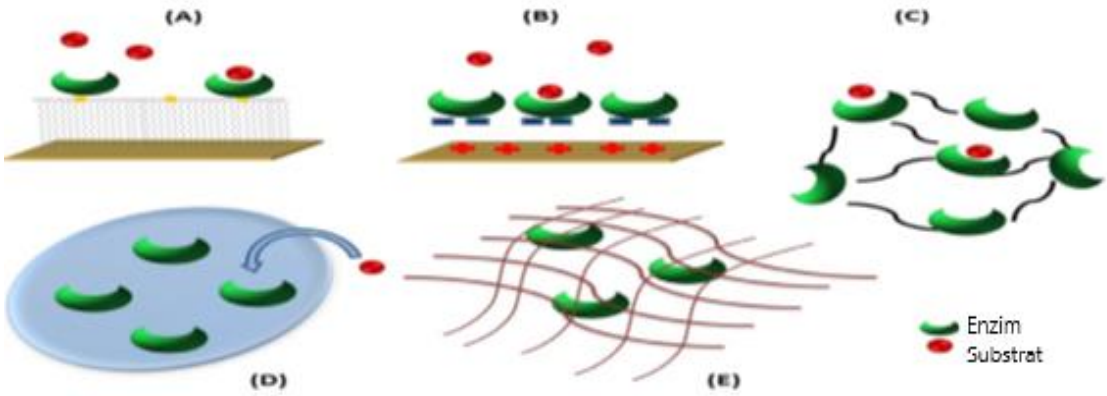
2.5. Enzim Biyosensörleri için Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon, enzimin biyosensör yüzeyine bağlanması için yaygın olarak kullanılan yöntemdir (Roy, Abraham, Abhijith, Kumar & Thakur, 2005). Enzim immobilizasyonunun genel olarak iki yöntemi tanımlanmıştır; birincisi adsorbans, mikrokapsülleme ve tutuklamayı kapsayan fiziksel yöntem, ikincisi çapraz ve kovalent bağlamayı kapsayan kimyasal yöntemdir (Sheldon, 2007).

İmmobilizasyon yönteminin seçimi biyoreseptörün doğasına ve uygulanmasına bağlıdır. Ayrıca, biyosensör uygulamaları için kullanılan transduser tipini, analitin fizikokimyasal özelliklerini ve biyosensörün çalışacağı çalışma koşullarını dikkate almak gerekmektedir (Singh, Verma, Garg & Redhu, 2008).

2.5.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyosensörlerde yaygın immobilizasyon yöntemleri kovalent bağlama, adsorpsiyon, çapraz bağlama, mikrokapsülleme ve tutuklamadır (Şekil 2.3) (Fernandez-Fernandez, Sanroman & Moldes, 2013).



Şekil 2.3. Biyosensörde kullanılan yaygın immobilizasyon yöntemleri; (A) kovalent bağlama, (B) adsorpsiyon, (C) çapraz bağlama, (D) mikrokapsülleme ve (E) tutuklama (Rodriguez-Delgado vd., 2015)

2.5.1.1. Kovalent Bağlama

Bu yöntem, taşıyıcı ile enzim arasında oluşan kovalent bağ oluşumuna dayanmaktadır. Enzim veya proteinlerdeki aminoasitlerin yan zincirlerinden kaynaklanan fonksiyonel gruplar kimyasal olarak aktifleştirilmiş desteklere kovalent olarak bağlanabilmektedir. Kovalent bağlama yöntemine göre immobilizasyon, taşıyıcının aktivasyonu, biyomolekülün bağlanması ve sadece adsorblanmış biyomoleküllerin uzaklaştırılması olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemle ilgili en sık karşılaşılan dezavantajlardan biri, enzimin aktif merkezinden gerçekleşen bir kovalent bağlanmanın enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olmasıdır (Çoban, 2008).

2.5.1.2. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, basit, düşük maliyetli ve hızlı bir immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntemde enzim, Van der Waals bağları, hidrojen bağları veya iyonik etkileşimler gibi zayıf çekim kuvvetleri etkisiyle bir desteğe sabitlenebilmektedirler. Bu yöntemle immobilize edilen enzimler mekanik olarak kararsız olabilir ve reaksiyon koşulları altında taşıyıcıdan kolayca ayrılabilmektedir (Brady & Jordaan, 2009).

2.5.1.3. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama, kimyasal veya fiziksel yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Kimyasal yöntem, enzim ile taşıyıcı arasında glutaraldehit veya toluen diizosiyanat gibi bir veya çok işlevli reaktifler aracılığıyla kovalent bağların oluşumunu içermektedir. (Vastarella, 2001). Çapraz bağlama yöntemi, basit bir yöntem olmanın yanı sıra biyomoleküllerin güçlü bir şekilde kimyasal bağ oluşturma avantajlarını sunmaktadır. Yöntemin ana dezavantajı, proteinin katalitik olarak gerekli bölgelerinin kimyasal değişimlerinden kaynaklanan aktivite kayıpları olasılığıdır (Çoban, 2008).

2.5.1.4. Mikrokapsülleme

Mikrokapsülleme, biyolojik bileşenlerin yarı geçirgen bir membran içinde çevrelenmesiyle elde edilmektedir. Tutuklama yöntemine çok benzerdir, ancak moleküller belirli bir alanda sınırlandırılmıştır. Moleküllerin membran içine veya dışına transferi için itici güç moleküler ağırlıktır. Büyük molekül ağırlıklı moleküller membran dışına çıkamamakta veya içine girememektedirler. Ancak, küçük molekül ağırlıklı substratlar ve ürünler yarı geçirgen membrandan serbestçe geçebilmektedirler. Bu yöntemin belirgin bir avantajı, enzim/hücrenin istenen herhangi bir oranda birlikte immobilize edilebilmesidir. Ancak, difüzyonla ilgili sorunlarla sıkça karşılaşılmakta olup reaksiyon ürünlerinin hızlı bir şekilde birikmeleri membranın yırtılmasına neden olabilmektedir (Vastarella, 2001).

2.5.1.5. Tutuklama

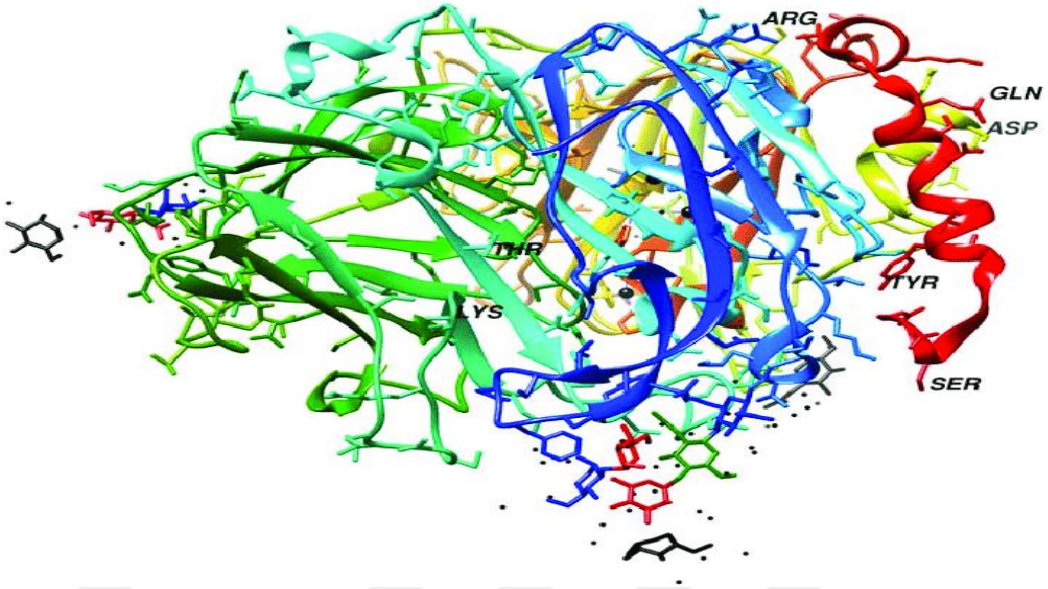
Tutuklama yöntemi kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirilen enzimler, çözelti içinde serbest ancak tutuklama sisteminin kafes yapısı tarafından sınırlandırılmış durumdadırlar. Tutuklama için üç genel yöntem vardır. Birincisi, enzimler elektrokimyasal dedektörü kaplayan ince bir film olarak analit geçirgen bir membran arkasına tutuklanabilirler. İkincisi, poliakrilonitril, agar jel, poliüretan veya polivinil alkol membranları, sol jeller veya redoks hidrojelleri gibi polimerik bir matriks içinde biyoreseptörler tutuklanabilmektedir. Son olarak, biyoreseptörlerin tek tabakalı veya çift tabakalı lipid membranlar içine tutuklanmasıdır (Çoban, 2008).

En çok kullanılan teknik, dökme veya elektropolimerizasyon yoluyla polimerik filmde ve redoks jel kafesinde tutuklamadır. Tutuklama yönteminde jelin gözenek yapısı önemli bir parametredir. Jelin gözenek yapısı, enzim çözeltisinin sızıntısını önleyecek kadar sıkı olmalı ve aynı zamanda substratların ve ürünlerin serbest geçişine izin vermelidir (Vastarella, 2001).

2.6. Lakkazlar

Enzimler, kimyasal reaksiyon mekanizmalarına göre altı ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır (Streffer, 2002). Ticari olarak temin edilebilen enzimler arasında oksidazlar, biyosensör uygulamalarında en sık kullanılanlardır. Bu tip enzim, stabil olma avantajlarını sunmaktadır ve bazı durumlarda koenzim veya kofaktör gerektirmemektedir (Mello & Kubota, 2002). Oksidoredüktazlar altı gruba ayrılmaktadır; oksidazlar, dehidrojenazlar, peroksidazlar, redüktazlar, monooksijenazlar ve dioksijenazlar. Oksidazlar, hidrojeni bir substrattan moleküler oksijene aktarabilen enzimlerdir. Oksidazlar ayrıca kataliz sırasında oluşan ürüne göre iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar, su üreten (bakır içeren) oksidazlar ve hidrojen peroksit üreten oksidazlardır. Bakır içeren oksidaz enzimi olan lakkaz, biyosensör uygulamalarında en sık kullanılan enzimdir (Streffer, 2002).

Lakkazlar (EC 1.10.3.2, *p*-difenol:dioksijen oksidoredüktaz), fenolik bileşikler ve aromatik ya da alifatik aminler gibi fenolik olmayan çeşitli substratların oksidasyonunu katalize eden multimerik ve monomerik bakır içeren oksidoredüktazlardır. Substratın katalizi sırasında "elektron alıcısı" olarak moleküler oksijen görev yapar ve suya indirgenir. Lakkaz ilk kez 1883'de Yoshida tarafından Lacquer ağacında tanımlanmıştır. Şimdiye kadar tanımlanan en eski enzimdir (Mayer & Staples, 2002). Lakkazlar doğada bitkiler, funguslar, böcek ve hatta bakteri türleri de dahil olmak üzere yaygın şekilde farklı formlarda bulunmaktadırlar. Farklı lakkazlar arasında, *Trametes* suşlarından izole edilen enzimlerin diğerlerine göre genellikle kararlı olduğu belirtilmektedir (Ncanana, Baratto, Roncaglia, Riva & Burton, 2007). *T. versicolor* lakkazı'nın 3 boyutlu modellenmiş yapısı Şekil 2.4'te verilmiştir (Malinowski, Herbert, Rogalski & Jaroszynska-Wolinska, 2018).



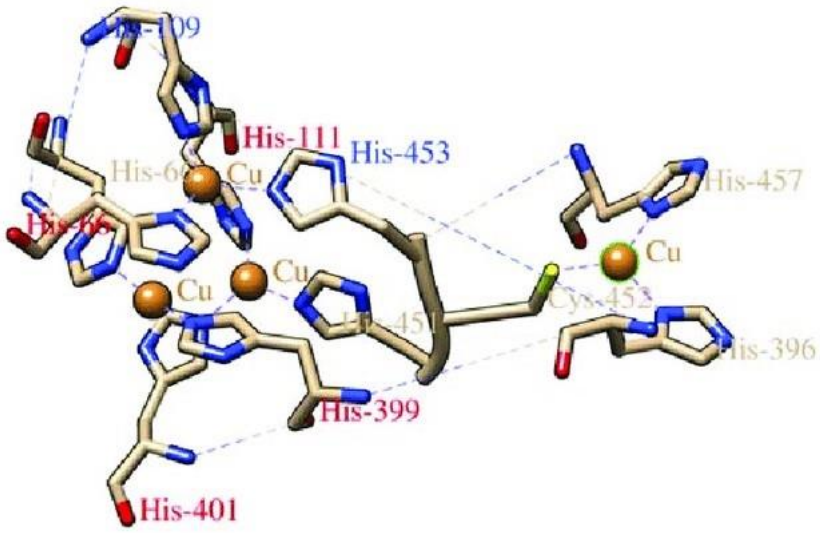
Şekil 2.4. *T. versicolor* lakkazı'nın 3 boyutlu modellenmiş yapısı (Malinowski vd., 2018)

Lakkazlar, dimerik veya tetramerik glikoproteinlerdir. Enzimin katalitik mekanizmalarında önemli bir rol oynayan üç merkezde bulunan 4 farklı bakır atomu içermektedir. Bu bakır bölgeleri, açığa çıkan kendilerine özgü elektronik paramanyetik rezonans (EPR) sinyallerine göre üç tipe ayrılmaktadır:

- Tip 1 bakır (T1): Paramanyetik 'mavi' bakır, okside formda 610 nm'de absorbans gösterir.
- Tip 2 bakır (T2): Paramanyetik 'mavi olmayan' bakır, görünür bölgede absorbans göstermez.
- Tip 3 bakır (T3): Diamanyetik spin eşleşmeli bakır-bakır çifti, okside formda 330 nm'de absorbans gösterir.

T1, korunmuş ekvatoral ligandlar olarak iki histidin-bir sistein ve genellikle değişken bir ligand içeren trigonal bir koordinasyona sahiptir. Yaklaşık +790 mV'luk yüksek redoks potansiyeli nedeniyle substrat oksidasyonunun gerçekleştiği bölgedir. T2, görünür spektrumda absorpsiyon göstermediğinden renksizdir ve EPR çalışmalarında paramanyetik özelliklerini ortaya çıkarmaktadır. T3 bakırın yakınında stratejik olarak konumlanan T2, T3 ile birlikte trinükleer merkezi meydana getirmektedir. T3, UV spektrumuna yakın değerlerde zayıf bir soğurma sağlamaktadır.

T. versicolor lakkazı'nın 3 boyutlu modellenmiş bakır koordinasyon merkezinin şematik gösterimi Şekil 2.5'te verilmiştir (Malinowski vd., 2018).

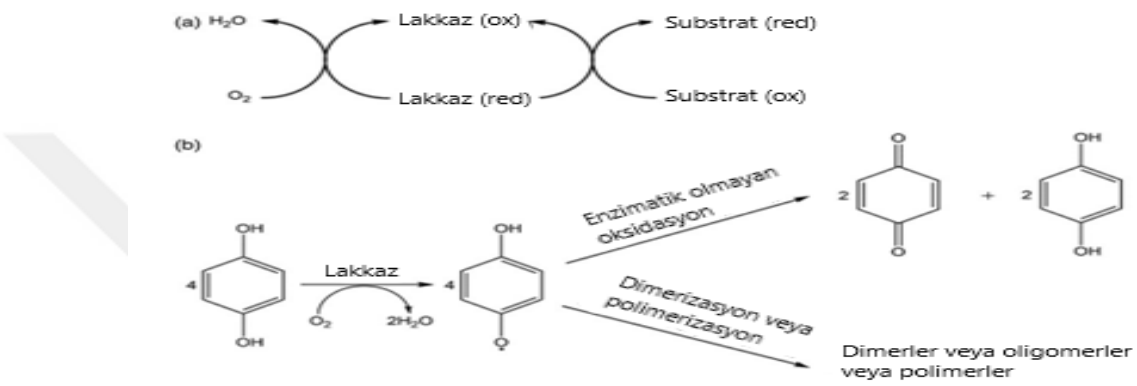


Şekil 2.5. *T. versicolor* lakkazı'nın 3 boyutlu modellenmiş bakır koordinasyon merkezinin şematik gösterimi (Malinowski vd., 2018)

T1'in bulunduğu mononükleer merkezde substratın oksidasyon reaksiyonu gerçekleşirken, T2 ve T3'ü içeren trinükleer merkezde ise moleküler oksijen suya indirgenmektedir (Gül vd., 2017).

Lakkazın aktif bölgesindeki bakır iyonları, oksidasyon durumlarını Cu (II) ve Cu (I) arasında değiştirerek elektron transfer mekanizması sağlar. T1 merkezinin işlevi, substrattan T2/T3 redoks bakır merkezine uzun menzilli molekül içi elektron transferini sağlamaktır. T2/T3 bakır merkezi, oksijenin indirgenmesinde önemli bir rol oynar. İki T3 bakır arasında, T2 ve T3 bakır iyonları ile koordine olan OH^- veya O^{-2} olan bir oksijen ligandı bulunmaktadır. Çözücü ve oksijenin T2/T3 merkezine iki kanaldan erişimi vardır. Tamamen indirgenmiş trinükleer bakır merkezi, dioksijen ile reaksiyona girerek peroksit seviyesinde bir ara ürün oluşturur ve son olarak da moleküler oksijen suya indirgenir (Decker & Terwilliger, 2000; Duran, Rosa, D'Annibale & Gianfreda, 2002; Ivnitski & Atanassov, 2007; Madhavi & Lele, 2009).

Lakkazlar, radikal katalizli mekanizmaya sahip reaksiyonlar verirler. Peroksidazlar ve tirozinazlar ile birlikte fenol oksitleyici enzimler grubunun en büyük topluluğunu oluşturan bu oksidoredüktaz enzimleri, reaksiyon türüne bağlı olarak elektronların substrattan bir elektron alıcısına transferini katalizlemektedirler. Oluşan kataliz reaksiyonlarında, lakkaz ve tirozinaz için elektron alıcısı serbest O_2 molekülü iken peroksidaz için H_2O_2'dir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. (a) Substrat oksidasyonu için lakkaz katalizli redoks döngülerinin şeması; (b) hidrokinonun lakkaz ile oksidasyonu (Su, Fu, Wang, Silva & Cavaco-Paulo, 2018)

Tipik bir lakkaz reaksiyonunda, fenolik substratlar birer elektron kaybederek fenoksil radikallere dönüşmektedir. Toplamda 4 kez oksitlenerek oluşan reaktif radikaller enzimatik olmayan oksidasyona uğrayabilmekte ya da oksidatif eşleşmeler sonucunda oligomer ve/veya polimerlere dönüşebilmektedirler (Duran vd., 2002; Minussi, Pastore & Duran, 2002).

Lakkazların substrat spesifitesi, fenolik ve fenolik olmayan bileşik gruplarının dahil olduğu oldukça geniş bir aralıktadır. Yüksek redoks potansiyeline sahip büyük moleküller ve bazı fenolik olmayan bileşikler, lakkazlar tarafından "medyatör" denilen elektron taşıyıcı küçük moleküller yardımı ile okside edilebilmektedirler.

Lakkazların farklı endüstriyel alanlarda kullanılan çok çeşitli fenolik bileşikleri oksitleyebilmesi, biyoteknolojik potansiyellerini arttırmıştır. Kataliz tepkimeleri sırasında yardımcı substrat olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanmamaları ve herhangi

bir kofaktöre ihtiyaç duymadan gerçekleştirdikleri kataliz reaksiyonları lakkazların kullanımını oldukça avantajlı kılmaktadır (Gamella vd., 2006; Roy vd., 2005). Lakkazların en yaygın kullanım alanları, tekstil ve kağıt sanayilerinde lignin ağartma ve parçalama (Morozova, Shumakovich, Shleev & Yaropolov, 2007), atık su arıtımında boyaların renginin giderilmesi ve ksenobiyotiklerin parçalanması (Almansa, Kandelbauer, Pereira, Cavaco-Paulo & Guebitz, 2004; Junghanns, Moeder, Krauss, Martin & Schlosser, 2005), gıda endüstrisi (Morozova vd., 2007) ve biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesidir (Jensen vd., 2012; Tan vd., 2009).

Enzim biyosensörlerinin tasarımında geniş yer bulan lakkazlar, çevresel ve tıbbi analizlerde, gıda ve atık sulardaki fenolik bileşiklerin tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Di Fusco, Tortolini, Deriu & Mazzei, 2010; Ferreira, Silva, Freitas, Rocha-Santos & Duarte, 2009; Gamella vd., 2006; Ghindilis, Gavrilova & Yaropolov, 1992; Quan & Shin, 2004; Tang vd., 2008; Torrecilla vd., 2007).

2.7. Enzim Biyosensörlerinin Sınıflandırılması

Biyosensör ile yapılan ölçümlerde, biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre, enzim biyosensörleri yaygın olarak aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır:

1. Elektrokimyasal temelli enzim biyosensörleri
    - Amperometrik temelli enzim biyosensörleri
    - Potansiyometrik temelli enzim biyosensörleri
    - Yarı iletken temelli enzim biyosensörleri
2. Optik temelli enzim biyosensörleri
    - Absorbsiyon temelli optik enzim biyosensörleri
    - Flurosans temelli optik enzim biyosensörleri
    - Biyoluminesans temelli optik enzim biyosensörleri
3. Piezoelektrik temelli enzim biyosensörleri
4. Kalorimetrik temelli enzim biyosensörleri (Telefoncu, 1999).

2.7.1. Elektrokimyasal Temelli Enzim Biyosensörleri

Elektrokimyasal temelli enzim biyosensörleri, analitlerin oksidasyonundan kaynaklanan akım değişimini, potansiyel farkı veya iletkenlikteki değişimi ölçmektedir. Dedektör sistemi tarafından ölçülen bu özelliklere bağlı olarak elektrokimyasal temelli enzim biyosensörleri; amperometrik, potansiyometrik, yarı iletken temelli enzim biyosensörlerine şeklinde sınıflandırılmaktadır (Rodriguez-Delgado vd., 2015). En yaygın kullanım alanına sahip biyosensör tasarımları elektrokimyasal temellidir (Arora, Sindhu, Dilbaghi & Chaudhury, 2011).

2.7.1.1. Amperometrik Temelli Enzim Biyosensörleri

Amperometrik temelli enzim biyosensörleri, potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak sabit tutulduğu voltametrik biyosensörlerin özel bir sınıflandırmasıdır. Bu yöntem, belirli bir hedef analitin tanınması için enzimin seçiciliğini, biyokatalitik reaksiyon hızının doğrudan bir akım sinyaline dönüştürülmesi ile birleştirerek çeşitli bileşiklerin hızlı, basit ve doğrudan belirlenmesine olanak tanımaktadır.

Amperometrik ölçümlerde genellikle üçlü elektrot sistemi kullanılmaktadır. Çalışma elektrodu, elektrokimyasal bir sistemde reaksiyonun meydana geldiği elektrot olarak ifade edilmektedir. Karşıt elektrot, çalışma elektrodu bir anot olarak çalıştığında katot işlevi görmektedir ve bunun tersi de geçerlidir ve çalışma elektroduna göre yüzey alanı daha geniştir. Karşıt elektrotta meydana gelecek yarı reaksiyonun hızı, çalışma elektrodunda gerçekleşen işlemin sınırlanmasını engelleyecek yükseklikte olmalıdır. Karşıt elektrodun potansiyeli, referans elektroda karşı ölçülemiyor olsa da çalışma elektrodunun yüzeyinde meydana gelecek reaksiyonu dengeleyecek şekilde ayarlanabilmektedir. Bu konfigürasyon, çalışma elektrodunun potansiyeli bilinen referans elektrodununkine karşı ölçüm yapabilmesini sağlamaktadır. Karşıt elektrotlar elektrokimyasal olarak daha inert olan malzemelerden üretilmektedir. Bu elektrotlara, altın, platin veya karbon örnek olarak verilebilir. Referans elektrot, bir tür standart hidrojen elektrottur. Hidrojen patlayıcı bir madde olduğundan dolayı ölçümler için hidrojen gazı içeren bir elektrot kullanılması çok uygun değildir. Referans elektrot olarak sıklıkla, Ag/AgCl elektrodu kullanılmaktadır. Genellikle, akım düşükse karşıt

elektrot olarak referans elektrodu işlev görmektedir. Referans elektroduna göre platin, altın veya karbon temelli çalışma elektrodunda sabit potansiyel korunarak ölçümler gerçekleştirilmektedir (Çoban, 2008).

Amperometrik esaslı enzim biyosensörleri, sabit bir potansiyelde, enzimatik reaksiyon sırasında harcanan ya da açığa çıkan maddenin derişimi ile orantılı olarak gerçekleşen akım değişiminin ölçülmesi esaslıdır. Bu yüksek duyarlılıklı biyosensörler, biyolojik test numunelerinde bulunan elektroaktif türleri tespit edebilmektedir (Koyun, Ahlatçıoğlu & Koca-İpek, 2012). Amperometrik temelli enzim biyosensörleri, çözücü ortamında hızlı ve seçiciliği yüksek analiz uygulamalarına sahiptir. Ayrıca, düşük maliyetle üretilebilen, taşınabilir ve otomasyona uygun biyosensör tasarımları için avantajlı sistemlerdir (Goode, Rushworth & Millner, 2015; Sharma & Mutharasan, 2013).

2.7.1.2. Potansiyometrik Temelli Enzim Biyosensörleri

Potansiyometrik temelli enzim biyosensörleri, tüm biyosensörler arasında en az yaygın olandır, ancak yine de bu tip biyosensörlerde farklı teknikler bulunabilmektedir. Ölçülen parametre bir elektrokimyasal reaksiyonun oksidasyon veya redüksiyon potansiyelidir. Çalışma prensibi, çözeltideki bir elektroda voltaj uygulandığında, oluşan elektrokimyasal reaksiyonlar sonucunda bir akımın meydana gelmesine dayanmaktadır. Bu reaksiyonların meydana geldiği voltaj, belirli bir reaksiyonu ve belirli türleri göstermektedir (D'Souza, 2001; Syam, Davis, Pratheesh, Anoopraj & Joseph, 2012).

2.7.1.3. Yarı İletken Temelli Enzim Biyosensörleri

Yarı iletken temelli enzim biyosensörleri, numune çözeltisinin elektrik iletkenliğindeki değişikliklerin izlenmesini içermektedir. Ölçülen parametre, çözeltinin elektriksel iletkenliği veya direncidir. Elektrokimyasal reaksiyonlar iyon veya elektron ürettiğinde, çözeltinin genel iletkenliği veya direnci değişmektedir. Bu değişiklik ölçülmektedir ve uygun bir ölçekte kalibre edilmektedir. İletkenlik ölçümleri nispeten düşük duyarlılığa sahiptir (Lazcka, Del Campo & Munoz, 2007).

2.7.2. Optik Temelli Enzim Biyosensörleri

Optik temelli enzim biyosensörleri, fenolik bileşiklerin belirlenmesi için yüksek spesifikliğe, duyarlılığa ve maliyete sahip analitik cihazlar olarak geliştirilmiştir. Bu enzim biyosensörleri, optik kırınım veya elektrokemilüminesansa dayalı olarak yapılabilmektedir. Optik transduserler, bakterilerin doğrudan (etiketsiz) tespitine yönelik uygulama için özellikle idealdir. Bu biyosensörler, hücreler transduser yüzeyinde immobilize edilmiş biyoreseptörlere bağlandığında meydana gelen kırılma indisi veya kalınlığındaki küçük değişiklikleri tespit edebilmektedir. Işık özelliklerindeki doğrudan değişikliklerle derişim, kütle veya molekül sayısındaki değişiklikleri ilişkilendirmektedirler. Bakteriyel patojenlerin tespiti için monomod dielektrik dalga kılavuzları, yüzey plazmon rezonansı, elipsometri, rezonans aynası ve interferometre vb. dahil olmak üzere çeşitli optik teknikler bildirilmiştir (Lazcka vd., 2007; Syam vd., 2012).

2.7.3. Piezoelektrik Temelli Enzim Biyosensörleri

Piezoelektrik temelli enzim biyosensörlerinin genel amacı, kuvars denilen kendine özel titreşime sahip materyallerin üzerinde biriken hedef analitin kütle miktarının artmasıyla frekans miktarındaki azalmaya bağlı olarak analit miktarının belirlenmesidir. Yüzeye seçici olarak bağlanan bir analitin kuvarstaki kütlesi artarken açığa çıkan titreşimin rezonans frekansı orantılı olarak azalacaktır. Piezoelektrik temelli enzim biyosensörleri, immunosensör uygulamaları başta olmak üzere amonyak, azot oksitler, karbonmonoksit, hidrokarbonlar, hidrojen, metan, sülfür dioksit ve bazı organofosfat bileşiklerinin ölçümü için de kullanılmaktadır (Lazcka vd., 2007; Syam vd., 2012).

2.7.4. Kalorimetrik Temelli Enzim Biyosensörleri

Kalorimetrik temelli enzim biyosensörleri, biyolojik reaksiyonların temel özelliklerinden birini, yani ısının soğurulmasını veya üretilmesini kullanmaktadır ve bu da reaksiyonun gerçekleştiği ortamın sıcaklığını değiştirmektedir. İmmobilize enzim moleküllerini termal biyosensörleriyle birleştirerek oluşturulmaktadırlar. Analit enzimle temas ettiğinde, enzimin ısı reaksiyonu ölçülmektedir ve analit derişimine göre kalibre

edilmektedir. Bu tür biyosensörün yaygın uygulamaları, pestisitlerin ve patojenik bakterilerin tespitini içermektedir (Syam vd., 2012).

2.8. Biyosensörün Performans Faktörleri

İdeal bir biyosensörde istenen özellikler şunlardır:

Seçicilik: İdeal bir biyosensör için aranan önemli parametrelerden biri seçiciliktir ve biyosensörün sadece hedef analite özgünlüğünü ifade etmektedir. Hedef analit miktarının tam olarak tayin edilebilmesi için, ölçümler sırasında girişime neden olabilecek maddelerin biyosensör cevabına etkisi incelenmelidir. Girişime neden olabilecek maddelerin reaksiyon ortamından veya çalışılan örnekten uzaklaştırılması ya da girişime neden olabilecek maddelerden etkilenmeyen biyosensör tasarlanmasına dikkat edilmelidir.

Kullanım Ömrü: Biyosensörün performansının zamanla değişiminin belirlenmesi cihazın ne kadar süre hizmet verebileceğini belirleyecektir. Biyosensörün transduserinin aktivitesindeki düşüşler, cihazın kullanım ömrünü sınırlayan en önemli faktördür. Ayrıca bu durum, biyosensörün kalibrasyon sürecini, kararlılık ve tekrarlanabilirlik parametrelerini önemli oranda değiştirebilmektedir.

Kalibrasyon ve Duyarlılık: Duyarlılık, bir birimlik derişim değişikliğinin biyosensör tarafından algılanması sonucu zamanla verdiği sinyalde gerçekleşen değişim olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörün aktif tabakasında immobilize edilen biyoreseptörün sadece belirli maddelere duyarlı olması ideal biyosensör için istenen özelliklerden biridir. Biyosensörün duyarlılığı, analiz edilecek maddenin farklı derişimli çözeltileri için yapılan ölçümlerin sonuçları bir kalibrasyon grafiğine geçirilerek belirlenebilmektedir. Duyarlılık değişimi, kalibrasyon ölçümleri ile değerlendirilebilmektedir.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensörde, aynı koşullar altında gerçekleştirilen ardışık ölçümlerde yaklaşık aynı sonuçların elde edilmesi istenmektedir. Ölçümlerden elde edilen değerlerin standart sapma ve korelasyon katsayıları hesaplanarak tekrarlanabilirlik sonuçları değerlendirilebilmektedir. Tekrarlanabilirlik parametresinin karakterizasyonu son derece önemlidir ve iyi sonuçların elde edilmesi biyosensör uygulamalarının iyi olduğunu ifade etmektedir.

Kararlılık: Biyosensörün kullanım ömrünü belirleyen bir parametredir. Belirli bir süre boyunca biyosensörün duyarlılığındaki veya taban çizgisindeki değişiklikleri dikkate alarak belirlenmektedir. Kullanılan biyoreseptörün fiziksel dayanıklılığının iyi düzeyde olmasına bağlı olarak ideal bir biyosensör için istenen, yüksek elektrot kararlılığı sağlanabilmektedir. Enzim biyosensörlerinde, enzimin saflık düzeyi, enzim kaynağı ve enzim immobilizasyonu için seçilen teknikler bu cihazların kullanım sürecini belirlemektedir.

Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı: Biyosensör uygulamalarında tayin aralığı olarak adlandırılan bölge, biyosensör cevabı (akım)-derişim değerlerinden doğrusallığın elde edildiği derişim aralığıdır. Tayin sınırı ise, biyosensörün analiz edebileceği analitin en düşük derişimini ifade etmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin boyutu, biyoreseptörün belirlenecek maddeye affinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi etkenlerden etkilenmektedir.

Cevap Süresi: Biyosensörün hedef analitle temas etmesi ile biyosensörden alınan sinyalin kararlı duruma geçtiği zaman aralığına cevap süresi denmektedir. Ölçümler sırasında elde edilen sinyal-zaman eğrilerine göre, adımların şekli düz ve genişse cevap süresi uzun, dar ise kısadır (Özcan, 2010).

2.9. Gıdalarda Fenolik Bileşik Tayini ile ilgili Biyosensör Çalışmaları

Fenolik bileşiklerin gıdalardaki tayini için genellikle lakkaz, yaban turpu peroksidaz ve tirozinazlar gibi polifenol oksidaz enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonların kullanıldığı farklı enzim biyosensörleri geliştirilmiştir.

Literatür incelendiğinde, biyosensör uygulamalarında diğer oksidoredüktaz enzimlerine göre önemli avantajlar sunan lakkaz enzimlerin kullanıldığı çalışmaların sayısının oldukça yüksek olduğu ve enzimin çeşitli immobilizasyon yöntemleri ile karbon pasta elektrot, camsı karbon elektrot, altın elektrot, karbon fiber elektrot, grafit elektrot, screen-printed elektrot ve platin elektrot gibi farklı elektrotlara immobilize edildiği görülmektedir (Gomes vd., 2004).

Gomes vd. (2004), kırmızı şaraptaki fenolik bileşikleri belirlemek için platin elektroda lakkazın adsorpsiyonu temelli amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen biyosensör ile kateşin ve kafeik için +100 mV potansiyelde gerçekleştirilen

ölçümler sonucunda, 0,1 M asetat tamponu, pH 3,5'te en yüksek cevabın elde edildiği ve her iki fenolik bileşik için de doğrusal tayin aralığının 2,0-14,0 μM olduğu rapor edilmiştir.

Carralero-Sanz, Luz-Mena, Gonzalez-Cortes, Yanez-Sedeno & Pingarron (2005), tirozinaz enzimini altın nanoparçacık ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrota glutaraldehit kullanılarak çapraz bağlanmasına dayalı bir biyosensör geliştirmişlerdir. Kırmızı ve beyaz şaraplardaki fenolik bileşik içeriğini tespit etmek için kullanılan biyosensör ile fenol, kateşol, kafeik asit, klorojenik asit, gallik asit ve protokateşik aldehit için -100 mV sabit potansiyelde, 0,1 M fosfat tamponu ve pH 7,4'te en yüksek cevabı verdiği ve geliştirilen biyosensörün ömrünün en az 18 gün olduğu rapor edilmiştir.

Gamella vd. (2006) şaraplardaki toplam fenolik bileşik içeriğinin ölçümü için, lakkaz temelli amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Lakkaz, camsı karbon elektrot üzerine glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir. Biyosensör ile -200 mV sabit potansiyelde gallik asit ve kafeik asit için gerçekleştirilen kesikli ve akış enjeksiyonlu kesiksiz ölçümler sonucunda, 0,1 M sitrat tamponu, pH 5,0 değerinde en yüksek cevabın elde edildiği rapor edilmiştir. Ölçülen doğrusal tayin aralıkları gallik asit için, 0,003-0,80 mg/L; kafeik asit için 0,07-10x10^{-2} mg/L'dir.

Abhijith, Kumar, Kumar & Thakur (2007), siyah çaydaki fenolik bileşiklerin tayini için tironaz temelli amperometrik bir biyosensör geliştirmişler ve biyosensörün en yüksek cevabını 0,1 M fosfat tamponu, pH 7,0 ve 30°C'de elde etmişlerdir. Geliştirilen biyosensör ile kateşinin doğrusal tayin aralığı 10-80 mM olarak karakterize edilmiş olup +4°C'de depolanan biyosensörün 10 gün ve 80 analiz sonucunda aktivitesinin % 50'sini koruduğunu gözlemlemişlerdir.

ElKaoutit vd. (2008), çeşitli bira örneklerindeki fenolik bileşiklerin tayini için camsı karbon elektroda lakkazın tutuklama yöntemiyle immobilizasyonuna dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. -150 mV çalışma potansiyelinde yapılan amperometrik ölçümler sonucunda en yüksek biyosensör cevaplarını 0,05 M asetat tamponu (pH 5,0) ve 22°C sıcaklıkta elde etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, kafeik asit için doğrusal tayin aralığı ve cevap süresi sırasıyla 0,04-2,00 μM ve 16 s olarak

belirtilmiş olup biyosensörün üç hafta sonunda aktivitesinin % 84,6'sını koruduğu tespit edilmiştir.

Cortina-Puig, Munoz-Berbel, Calas-Blanchard & Marty (2010), çaydaki fenolik bileşiklerin belirlenmesi için tirozinazın diazonyum türevli altın screen-printed elektroda immobilize edilmesine dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Enzim glutaraldehit ile çapraz bağlanarak elektrota immobilize edilmiştir. Biyosensör ile ölçümler sabit potansiyel değeri -200 mV'ta gerçekleştirilmiş olup kateşol için en yüksek cevap pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponunda elde edilmiştir. Kateşolün doğrusal tayin aralığını 0,1-22 µM olarak belirlemişlerdir.

Diaconu, Litescu & Radu (2010), *Salvia officinalis* ve *Mentha piperita* nane özlerinin toplam fenolik içeriklerinin belirlenmesi için altın-lakkaz-çok duvarlı karbon nanotüp-kitosana dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen biyosensör ile rozmarinik asitin doğrusal tayin aralığı 0,91-12,1 µM olarak belirlenmiştir. Lakkazın tutuklanma yöntemiyle immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensörün, McIlvaine tamponunda (pH 4,5) 15 ölçüm sonunda aktivitesinin % 90'ını koruduğu rapor edilmiştir.

Di Fusco vd. (2010), şarap örneklerinde fenolik bileşik içeriğinin belirlenmesi için lakkaz temelli amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. İmmobilizasyon yöntemi olarak çapraz bağlama yöntemi kullanılmıştır. Gallik asit için -100 mV değerindeki sabit potansiyelde gerçekleştirilen ölçümler sonrasında biyosensörün en iyi cevabının 0,1 M Britton-Robinson tamponu, pH 5,0, kullanılarak elde edildiği rapor edilmiştir. Geliştirilen biyosensörün gallik asit ile 0,1-17 µM doğrusal tayin aralığında çalışılmasına uygun olduğu belirtilmiştir.

Granero, Fernandez, Agostini & Zon (2010), şarap ve çaydaki toplam fenolik içeriğin belirlenmesi için peroksidaz enzimine dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. İmmobilizasyon yöntemi olarak tutuklama yöntemi kullanılmıştır. Peroksidaz temelli biyosensör ile resveratrol ve kafeik asit için gerçekleştirilen ölçümler sonrasında optimum çalışma koşulları, fosfat tamponu pH 7,0 ve 25°C olarak belirlenmiş olup geliştirilen biyosensörün şarap ve çay örneklerindeki fenolik madde tayininde kullanılabilir olduğu belirtilmiştir.

Ibarra-Escutia, Gomez, Calas-Blanchard, Marty & Ramirez-Silva (2010), çay infüzyonlarında fenolik bileşiklerin belirlenmesi için indirgenmiş polivinil alkol fotopolimeri içinde grafit screen-printed elektrot üzerine lakkazın tutuklanmasına dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişler ve kafeik asit, kateşol, hidrokinon, rezorsinol için ölçümler gerçekleştirmişlerdir. Biyosensörün en iyi aktiviteyi 0,1 M asetat tamponunda ve pH 4,7'de verdiğini belirtmişlerdir. Tüm ölçümleri -300 mV potansiyelde ve 30°C'de gerçekleştirmişlerdir. Biyosensörün +4°C'de depolandığında 2 aylık sürenin sonunda aktivitesinin % 90'ını koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Litescu, Eremia, Bertoli, Pistelli & Radu (2010), *Salvia officinalis* özlerinin fenolik bileşiklerinin belirlenmesi için screen-printed elektrotları üzerine lakkazın adsorpsiyon ile immobilize edilmesine dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör ile 0,1 M sitrat tamponunda (pH 4,5) ve -200 mV potansiyelde çalışmışlardır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, rozmarinik asit için cevap süresi 100 s, +4°C'de depolanan biyosensörün 98 günlük süre sonunda korunan aktivitesinin % 92 oranında olduğu belirtilmiştir.

Montereali, Della Seta, Vastarella & Pilloton (2010), şıra ve şaraptaki fenolik bileşiklerin belirlenmesi için grafit screen-printed elektroda immobilize edilen lakkaz-tirozinaz ikili enzim sistemine dayalı bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Enzimleri ferrosen ile tutuklayarak immobilize etmişlerdir. Biyosensörün en iyi aktiviteyi 0,1 M fosfat tamponunda, lakkaz enzimi için pH 6,0'da, tirozinaz enzimi için pH 6,5'te verdiğini belirtmişlerdir. Fenol için ölçümleri, +50 mV potansiyelde ve oda sıcaklığında gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen biyosensör, şıra ve şarap gibi üzüm ürünleri için beklenen sonuçları vermiştir.

Ünal & Kaşıkara-Pazarlıoğlu (2011), meyve sularının fenolik içeriğinin belirlenmesi için lakkaz temelli amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Enzimi jelatin matriksine tutuklayarak immobilize etmişlerdir. Kafeik asit ve ferulik asit için biyosensörün optimum çalışma koşulları 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 4,5) ve 35°C olarak belirtilmiş olup doğrusal tayin aralığı her iki fenol bileşiği için de 0-100 μM olarak rapor edilmiştir.

Chawla, Rawal, Sharma & Pundir (2012), meyve sularındaki fenolik içeriğin belirlenmesi için nikel nanoparçacık/karbosilatlı çok duvarlı karbon nanotüp/polianilin/

altın elektrot yüzeyine *Ganoderma* sp. lakkazını kovalent bağlama yöntemi ile immobilize ederek amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör ile 0,1 M asetat tamponu (pH 5,5), 35°C çalışma koşullarında ölçümler alınmıştır ve gayakol için doğrusal tayin aralığı, cevap süresi ve tayin sınırı sırasıyla; 0,1-10 µM, 8,0 s ve 0,05 µM olarak belirtilmiştir. +4°C'de depolanan enzim elektrotu için 4 aylık süre boyunca 200 kez kullanıldığında aktivitesinin % 85'ini koruduğu rapor edilmiştir.

Han vd. (2012), yeşil çaydaki fenoliklerin belirlenmesi için camsı karbon elektrot yüzeyine tirozinazın immobilize edilmesine dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. İmmobilizasyon yöntemi olarak adsorpsiyonu kullanmışlardır. Biyosensör ile kateşol, kafeik asit ve kuersetin için 0,1 M fosfat tamponunda (pH 6,6), 50°C optimum çalışma koşullarında ölçümler gerçekleştirmişlerdir. Biyosensörün +4°C'de depolandığında 1 aylık sürenin sonunda aktivitesinin % 72'sini koruduğu belirtilmiştir.

Pundir, Rawal, Chawla, Renuka & Kuhad (2012), meyve suları ve alkollü içeceklerdeki toplam fenolik içeriğin belirlenmesi için nitroselüloz membran üzerine kovalent bağlanarak immobilize edilen *Ganoderma* sp. lakkaz temelli amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. 0,1 M asetat tamponunda (pH 6,0), 35°C ve +0,4 V sabit potansiyelde biyosensör ile yapılan ölçümler sonucunda, gayakol için doğrusal tayin aralığı ve cevap süresi sırasıyla, 0,05-30 µM ve 10 s olarak tespit edilmiştir. Biyosensörün +4°C'de depolandığında 4 aylık süre boyunca 100 kullanımdan sonra ilk aktivitesinin % 60'ını koruduğunu rapor etmişlerdir.

Rawal, Chawla, Devender & Pundir (2012), çay yaprağı özündeki fenolik içeriğin belirlenmesi için demir oksit nanoparçacıklar/karboksilatlı çok duvarlı karbon nanotüpler/polianilin/altın elektrodu üzerine immobilize edilmiş *Ganoderma* sp. lakkaza dayalı bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. İmmobilizasyon yöntemi olarak kovalent bağlamayı kullanmışlardır. Biyosensör ile +0,3 V potansiyelde alınan ölçümler sonrasında çalışma koşulları 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,0), 35°C olarak optimize edilmiştir. Gayakol için doğrusal tayin aralığı, cevap süresi ve tayin sınırı sırasıyla, 0,1-500 µM, 4 s ve 0,03 µM olarak bulunduğu rapor edilmiştir. +4°C'de depolanan enzim elektrodunun 5 aylık süre sonunda aktivitesinin % 75'ini koruduğu belirtilmiştir.

Amatatongchai, Sroysee, Laosing & Chairam (2013), toplam fenolik bileşik içeriğinin değerlendirilmesi için akış enjeksiyon sistemini kullanarak lakkaz temelli bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör ile ölçümler gallik asit için -0,05 V sabit potansiyelde gerçekleştirilmiştir. Gallik asitin doğrusal tayin aralığı 3-60 µM olarak belirlenmiştir. Biyosensör ile asya kurusu, bael yaprakları, lahana, zencefil, guduchi, yasemin ve dut ağacı çayı örnekleri için toplam fenolik bileşik içerikleri tespit edilmiştir.

Eremia, Vasilescu, Radoi, Litescu & Radu (2013), çay infüzyonlarında toplam fenolik içeriğin belirlenmesi için screen-printed karbon elektrodu kullanarak platin nanoparçacık ve indirgenmiş grafen oksit ile lakkazın adsorbe edilmesine dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Amperometrik ölçümler -100 mV potansiyelde gerçekleştirilmiştir. Biyosensör için en iyi cevaplar 0,1 M asetat tamponunda, pH 5,0 ve 24°C'de elde edilmiştir ve geliştirilen biyosensör ile kafeik asit için yapılan ölçümler sonrasında doğrusal tayin aralığı, cevap süresi ve tayin sınırı sırasıyla, 0,2-2 µM, 60 s ve 0,09 µM olarak rapor edilmiştir. Biyosensörün +4°C'de depolandığında 6 haftalık sürenin sonunda aktivitesini % 87,4 oranında koruduğu belirtilmiştir.

Nadifiyine vd. (2013), zeytinyağındaki fenoliklerin belirlenmesi için karbon pasta elektroduna çapraz bağlama ile immobilize edilmiş tirozinaza dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Amperometrik ölçümler, -150 mV sabit potansiyelde, 0,1 M fosfat tamponu, pH 6,5 reaksiyon ortamında yapılmıştır. Kateşol için doğrusal tayin aralığı ve cevap süresi sırasıyla, 0,013-150 µM ve 20 s olarak tespit edilmiştir. +4°C'de depolanan biyosensörün 21 günlük sürenin sonunda aktivitesinin % 100'ünü koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Lanzellotto vd. (2014), şaraptaki fenoliklerin belirlenmesi için altın elektroda lakkazın kovalent bağlanması ile hazırlanan amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör için çalışma koşulları, 0,1 M asetat tamponu (pH 4,5), 25°C ve -100 mV sabit potansiyel olarak rapor edilmiştir. Aynı koşullarda geliştirilen biyosensör ile gallik asit için doğrusal tayin aralığını 30-300 µM olarak tespit etmişlerdir. Biyosensörün +4°C'de 120 gün depolanması sonucunda aktivitesinin % 87'sini koruduğu rapor edilmiştir.

Boujakhrout vd. (2016), bitki çaylarının toplam fenoliklerinin belirlenmesi için camsı karbon elektrot üzerine lakkazın immobilize edilmesine dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. İmmobilizasyon yöntemi olarak çapraz bağlamayı kullanmışlardır. Biyosensör ile kateşol için en iyi aktiviteyi 0,1 M sodyum fosfat tamponunda, pH 5,5'te, 25°C'de ve -150 mV potansiyelde verdiğini ve kateşolün doğrusal tayin aralığını 0,2-15 µM olarak belirlemişlerdir. Biyosensörün cevap süresi 7 s olarak tespit etmişlerdir. Biyosensörün 4°C'de depolandığında 2 haftalık sürenin sonunda aktivitesinin % 100'ünü koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Vasilescu vd. (2016), kırmızı şaraptaki toplam fenolik içeriğin belirlenmesi için lakkaz temelli amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör ile kafeik asit için 0,1 M asetat tamponunda (pH 5,0), 24°C'de, 50 mV s^{-1} tarama hızında ve 50 mV potansiyelde çalışmışlardır. Kafeik asitin doğrusal tayin aralığını 0,38-100 µM olarak belirlemişlerdir. Biyosensörün 4°C'de depolandığında 4 haftalık süre boyunca aktivitesinin % 85'ini koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Verrastro vd. (2016), MAPLE tekniği ile screen-printed bir elektrot üzerine immobilize edilmiş lakkaz temelli amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörü çay infüzyonunda, *Muscari comosum* soğanlarındaki etanolik özde, siyah turp kökünde ve enginar yapraklarında toplam fenolik bileşik içeriğini tespit etmek için uygulamışlardır. Biyosensörün en iyi aktiviteyi 0,1 M asetat tamponunda, pH 5,5'te ve -200 mV potansiyelde verdiğini belirtmişlerdir. Kateşol için doğrusal tayin aralığı 1-60 µM olarak tespit edilmiştir.

Vlamidis, Gualandi & Tonelli (2017), meyve sularında fenolik bileşiklerin belirlenmesi için camsı karbon elektrodu kullanarak indirgenmiş grafen oksit ve çok duvarlı karbon nanotüp ile lakkazın immobilize edilmesine dayalı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Enzimi glutaraldehit, sığır serum albümin, kitosan ve nafyon gibi farklı ajanlar ile çapraz bağlayarak immobilize etmişlerdir. Biyosensörün en iyi aktiviteyi -100 mV potansiyelde, lakkaz enzimi için 0,1 M asetat tamponunda, pH 4,5'te, tirozinaz enzimi için 0,05 M fosfat tamponunda, pH 6,5'te verdiğini belirtmişlerdir. Kateşol için doğrusal aralığı ve cevap süresi 1-300 µM ve 30 s olarak tespit etmişlerdir. Biyosensörün 4 haftalık sürenin sonunda aktivitesinin % 93,3'ünü koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Lakkaz temelli biyosensörün performansı, diğer faktörlerin yanı sıra, immobilizasyon verimliliğine, test koşullarına (pH, sıcaklık, elektrolit çözeltisi, medyatörler), yüzey alanı başına immobilize edilen enzimlerin sayısına, kullanılan transdüksiyon sistemine ve aynı zamanda kullanılan enzimin tipine bağlıdır (Freire, Duran & Kubota, 2001; Leite, Fatibello-Filho & Barbosa, 2003a; Leite, Lupetti, Fatibello-Filho, Vieira & Barbosa, 2003b; Rosatto, Freire, Duran & Kubota, 2001).

2.10. Fenolik Madde Tayini Amaçlı Geliştirilen Biyosensör için Kullanılan Materyallere Genel Bakış

2.10.1. Karbon Pasta Elektrotlar

Karbon pasta elektrotlar, 1958 yılında Adams tarafından geliştirilmesinden bu yana elektroanalitik uygulamalar için kullanılan en yaygın karbon elektrotlardır (Mailley vd., 2004).

Bazı araştırmacılar karbon pasta elektrotların geliştirilmesini yıllara göre aşağıdaki bölümlere ayırmışlardır (Svancara, Vytras, Barek & Zima, 2001).

- 1959-1963 Karbon pasta ile ilgili ilk uygulamaları
- 1964-1965 Karbon pasta için ilk modifikasyonlar
- 1974-Elektrolitik bağlayıcılı karbon pastanın ilk kullanımı
- 1981-1990 Kimyasal olarak modifiye karbon pasta dönemi
- 1988-Biyolojik olarak modifiye karbon pasta elektrotlar
- 1991-Karbon pasta ile karşılaştırılan dirençli karbon kompozitler

Bu elektrotların ana malzemesi olan karbon pasta, karbon (grafit) tozu ve elektrolitik olmayan bir bağlayıcı karışımı içermektedir (Svancara, Vytras, Kalcher, Walcarius & Wang, 2009). Elektrolitik olmayan bağlayıcı, parafin yağı veya teflon gibi hidrofobik bir malzeme veya poliakrilamid gibi hidrofilik bir malzeme olabilmektedir. Bağlayıcının viskozitesi elektrot performansı üzerinde önemli bir etki göstermektedir. Karbon pasta, biyolojik bileşenlerin dahil edilmesi için uygun bir matrikstir. Bu matriks, enzimler, medyatör ve biyosensör arasındaki hızlı elektron transferi için yakın temaslarına izin vermektedir. Enzim ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrotları, önce enzim çözeltisi ve grafit tozunun karıştırılmasıyla hazırlanmaktadır. Daha sonra elde

edilen enzimatik toz mineral yağ ile karıştırılmaktadır. Elde edilen son pasta karışımı, plastik bir silindirik kartuşa doldurulmaktadır (Sassolas, Blum & Leca-Bouvier, 2012).

Karbon pasta elektrotlar, geniş bir potansiyel aralık ve yüksek elektrik iletkenliği sunmaktadırlar. Ayrıca, hazırlanması oldukça pratiktir. Birçok biyosensör materyalini bir arada içerebilen, yüzeyi kolayca yenilenebilen, kararlı, tekrarlanabilirlik özellikleri iyi ve düşük maliyetli elektrotlardır. Bu nedenle biyosensör ve biyosensör uygulamalarında sıkça kullanılmaktadır (Çoban, 2008; Kıralp, Toppare & Yağcı, 2003; Pedano & Rivas, 2000).

2.10.2. Jelatin

Jelatin, kolajenin hidrolizi ile elde edilen bir proteindir. Membran oluşturma yeteneği, biyolojik olarak parçanabilirliği, biyouyumluluğu, düşük maliyetli olması ve toksik olmaması gibi pek çok avantajından dolayı gıda ve ilaç endüstrisindeki uygulamaları yaygındır (Liu vd., 2010; Yao, Li, Xu & Zhu, 2007). Jelatin, biyomoleküllerin, nanoparçacıkların ve diğer maddelerin bir araya getirilmesi için bir matriks görevi görmektedir (Emregül vd., 2013). Oda sıcaklığında katı halde bulunan jelatinin sulu çözeltisi hazırlanarak belirli bir sıcaklık aralığına getirildiğinde şişme davranışı nedeniyle jel kıvamını almaktadır. Bu durum sıcaklık değişimine bağlı olarak geri dönüşümlüdür. Biyomoleküllerin tutuklama yöntemiyle immobilizasyonunda destek olarak kullanılmaktadır. Jelatin, sulu çözeltideki şişme davranışı ile birlikte moleküller arası etkileşimler yardımıyla biyomoleküller çevresinde hidrofilik bir ağ oluşturarak onların matriksinde tutuklanmasını sağlamaktadır. Kullanımı kolay bir immobilizasyon malzemesidir. Enzim biyosensörlerinin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılan jelatin enzime doğal bir mikro ortam sağlamaktadır ve ayrıca enzim ile elektrot arasında gerçekleşmesi beklenen elektron geçişleri için yeterli erişilebilirlik sağlamaktadır (Esposito, Cortesi & Nastrazzi, 1996; Odacı, Timur & Telefoncu, 2004; Periasamy, Chang & Chen, 2011; Sezgintürk, Göktuğ & Dinçkaya, 2005).

2.11. Üzüm ve Üzüm Ürünleri

2.11.1. Üzüm

Üzüm, asmagiller (Vitaceae) familyası, *Vitis* cinsine ait olan sarılgan bir bitkidir. M.Ö. 3500'lere kadar dayanan üzüm yetiştiriciliği Anadolu'da başlamıştır. İklim ve toprak yönünden seçici olmaması ve geniş ürün çeşitliliğine sahip olması nedeniyle dünyada ve Türkiye'de üretilen en önemli ana meyve ürünlerinden biridir. Ülkemizde sofralık, kurutmalık, şıralık üzüm, üzüm suyu, pekmez, hardaliye, şarap vb. gibi ürünlere dönüştürülerek katma değeri arttırılmaktadır (Güçer, Poyrazoğlu & Artık, 2021).

Üzüm, başta fenolik bileşikler olmak üzere antioksidan madde içerikleri açısından oldukça zengin bir meyvedir. İçeriğindeki en önemli fenolik bileşikler, antosiyaninler, flavan-3-ollar, flavonollar ve fenolik asitlerdir. Üzüm ve ürünleri, şeker, mineral maddeler, organik asit, azotlu bileşik, aroma maddeleri, enzimler ve vitaminler yönünden oldukça zengindir. Bir kilogram üzüm, 12-15 mg kuersetin, 2 mg'den az kemferol, 4,5 mg mirisetin, 19 mg kateşin ve 1-3 mg kumarik asit içermektedir (Coşkun, 2017). Üzümde fenolik bileşiklerin en geniş ve en önemli grubu antosiyaninlerdir. Doğal renk pigmentleri olarak bilinen antosiyanin içeriği, üzüm ve üzüm ürünlerinin (şarap, hardaliye vb.) kendilerine has kırmızı, mavi ve mor renklerini belirlemektedir. Antosiyaninler de dahil olmak üzere fenolik içerikleri ile yüksek oranda ilişkili etkileyici antioksidan özellikleri nedeniyle üzüm ve üzümden yapılan ürünlerin insan sağlığına yararları açısından potansiyel oluşturduğu bilinmektedir. Kırmızı üzümden elde edilen üzüm suyu ve kırmızı şaraptaki flavonoid içeriğinin, 500 mg/L'den fazla olduğu belirlenmiştir (Coşkun, 2017).

2017 yılı Türkiye İstatistik Kurumu'nun raporladığı verilere göre Türkiye'nin yaklaşık 417,000 hektarlık alanında 4,2 milyon ton civarında üzüm üretimi gerçekleştirilmiştir. Bölgemiz, Edirne ili ve ilçeleri toplam bağ alanı 18,985 da olup, 10,705 dekarında sofralık ve 8,280 dekarında şaraplık üzüm çeşitleri yetiştirilmektedir. Edirne İli, Uzunköprü İlçesi, Kırcasalih Beldesi'nde en çok Papazkarası ve Merlot üzüm çeşitleri yetiştirilmektedir. Tarihsel olarak da bağcılık geçmişi bulunan Kırcasalih Beldesi'nde üzüm, sofralık, şaraplık ve son zamanlarda hardaliye üretimi için kullanılan ticari bir üründür (Güçer vd., 2021; Korkutal, Bahar & Güvemli-Dündar, 2019).

2.11.2. Hardaliye

Hardaliye, üzüm suyu ve posasına ezilmiş hardal tohumu eklenerek hazırlanan geleneksel alkolsüz laktik fermente bir içecektir. Türkiye'de genellikle Trakya bölgesinde tercih edilmektedir. Hardaliye üretimi için küçük ölçekli zanaat yöntemleri uygulandığından, mevcut literatür geleneksel üretim yöntemlerinden bahsetmektedir (Aydoğdu vd., 2014). Hardaliye üretimi için tercih edilen üzüm türleri, Alphonse, Papazkarası, Pamit, Müşküle, Razaki, Kardinal, Cabarnet'tir. Hardaliyenin renk yoğunluğunun üzüm çeşitlerine ve üretim yöntemlerine bağlı olarak geniş ölçüde değiştiği bilinmektedir (Arıcı & Coşkun, 2001; Coşkun, 2017; Prado, Parada, Pandey & Soccol, 2008; Ünal, Şener, Şen & Yılmaztekin, 2015). Hardaliyenin besin değeri elde edildiği üzümlere ve üzümlerin fermantasyon sürecine göre değişmektedir. Fermantasyon, gıda korumasında kullanılan en eski yöntemlerden biridir (Coşkun, 2017). Fermente gıdalar dünyanın birçok yerinde yaygın olarak tüketilmektedir. Mikroorganizmalar (bakteri, küf ve mayalar) fermantasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Coşkun, Arıcı, Çelikyurt & Gülcü, 2012). Hardaliyenin fenolik içeriği nedeni insan vücudu için yüksek antioksidan etkiler sağlamaktadır ve oksidatif stresi önlemektedir, böylece kanser hücrelerinin oluşumunu engellemeye yardımcı olmaktadır. Ayrıca, besin değerine ilaveten sindirim sistemlerine yardımcı etkide bulunduğu bilinmektedir (Prado vd., 2008). Hardal yağları soğuk algınlığı, dolaşım bozuklukları ve bronşitin yanı sıra antimikrobiyal özellikler üzerinde tıbbi etkiye sahiptir (Aktaç, Hasköylü & Güneş, 2015).

Hardaliye üretimi için; kırmızı üzümlerin yıkanıp preslenmesinden sonra, öğütülmüş hardal tohumları (% 0,2) ve vişne yaprakları üst üste dizilerek tercihen ahşap (veya plastik, cam) musluklu bir fıçıya konur. Karışım yaklaşık 50°C'ye ısıtılıp tekrar soğutulduktan sonra koruyucu olarak benzoik asit (% 0,1) eklenebilmektedir. Fermantasyon başladıktan sonra, meyve suyu bir gün arayla sirküle edilmektedir. Fermantasyon süreci yaklaşık 10 gün olmak üzere oda sıcaklığında gerçekleştirilmektedir (Arıcı & Coşkun, 2001; Coşkun & Arıcı, 2006). Fermantasyon tamamlandıktan sonra, meyve suyu filtrelenip şişelenmektedir. Fermente edildikten sonra hardaliye, 3 ila 4 ay boyunca 4°C'de saklanmaktadır. Hardal tohumu ve benzoik asit şırada gerçekleşecek maya faaliyetlerini engellemektedir. Ayrıca hardal tohumu

içeriğinde allil izotiyosiyanat adı verilen uçucu yağlar bulunmaktadır. Bu yağlar, şırada çeşitli mikroorganizmaların oluşumunu önleyerek hardaliyenin raf ömrünün uzamasına katkıda bulunur. Siyah hardal tohumu ve istenirse ilave edilen vişne yaprağı hardaliyenin aromasını oluşturmaktadır. Hardaliye pH değerinin 3,21 ila 3,97 aralığında olduğu bildirilmiştir (Arıcı & Coşkun, 2001; Güven & Aksoy, 2009; Ünal vd., 2015; Coşkun, 2017).

2.11.3. Şarap

Şarap, üzüm şırasının fermantasyonu sonucu elde edilen alkollü içecektir. Tarih boyunca üretilen, şarap, toprak, iklim, doğru üzüm seçimi ve doğru üretim basamaklarına bağlı olarak oluşan kaliteli bir son üründür (Kennedy, 2007). Mevsimlik üzümün değerlendirilmesi açısından büyük önem taşıyan şarap, üzüm çeşidine ve kullanılan üretim tekniklerine göre kırmızı, beyaz veya pembe renkli şekilde elde edilmektedir. Kırmızı şarap üretiminde genellikle Merlot, Cabarnet Sauvignon, Boğazkere, Öküzgözü, Kalecik Karası, Pinot Noir, Shiraz ve Nebbiolo cinsi üzümler tercih edilirken, beyaz şarap üretiminde Chardonnay, Sauvignon Blanc, Narince, Misket ve Sultaniye cinsi üzümler tercih edilmektedir. Başta fenolik bileşikler olmak üzere özellikle kırmızı şarabın biyolojik yönden aktif bileşik içeriği çok yüksektir. Fenolik bileşikler, şarapların rengini, acı, buruk tadını belirleyici bir dizi önemli işleve sahip olup şarapların kalitesine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, antioksidan gücünü de belirlemektedirler (Campanella, Bonanni, Finotti & Tomasetti, 2004). Bir bardak kırmızı şarapta bulunan toplam fenol miktarı 200 mg iken, bir bardak beyaz şarapta 40 mg olduğu belirtilmiştir (Luximon-Ramma vd., 2005).

Şarap üretim aşamaları, salkım ayrımı, maserasyon, pres, filtrasyon, fermantasyon, yıllandırma ve şişelemedir. Şarabın kalitesini belirleyen duyusal, fiziksel-kimyasal ve mikrobiyolojik kriterler bulunmaktadır. Duyusal kriterler, şarabın renginin, berraklığının, dolgunluğunun, tat ve kokusunun kalitesini belirlemektedir. Alkol yüzdesi, alkol derecesi, asidite oranları (toplam, sabit, uçar), yoğunluk, toplam ve serbest SO_2, indirgen şeker ve sakkaroz, yabancı madde, kül ve ağır metal miktarları ise şarabın fiziksel ve kimyasal kalite kriterlerini belirler. Mikrobiyolojik kalite kriterleri ise küf, maya ve bakteri türlerinin varlığıyla ilişkilidir (Aktan & Kalkan, 2000).

Bu çalışmada, Trakya Bölgesi, Edirne İli, Kırcasalih Beldesi'nden toplanan Papazkarası üzüm çeşitlerinden geleneksel üretim yöntemleriyle yapılan hardaliye ve şarap örneklerinin toplam fenolik madde tayini için enzim temelli amperometrik bir biyosensör geliştirildi. Biyosensör, karbon pasta elektroda ticari *T. versicolor* lakkazının immobilizasyonu ile hazırlandı. Biyosensörün optimum çalışma koşullarının belirlenmesi için substrat olarak gallik asit kullanılarak amperometrik ölçümler yapıldı. Elde edilen optimum çalışma koşullarında biyosensörün karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Gerçek örnek çalışmalarında, ev yapımı hardaliye ve ev yapımı şarap için biyosensör ile elde edilen toplam fenolik madde tayin sonuçları elde edildi ve aynı örnekler için LC-MS/MS ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Biyosensör ile yapılan elektrokimyasal ölçümler, karbon pasta çalışma elektrodu (BASi® MF 2010), platin tel karşıt elektrot (Gamry, 0,4 mm çaplı) ve RE-5B Ag/AgCl referans elektrot (BASi® MF 2010) (3,0 M KCl içinde) üçlü elektrot sistemi ile PalmSens BV (Utrecht, Hollanda) şirketinden alınan PalmSens3® potansiyostat ve PSTrace® yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışmamızda, ultrasonik su banyosu (Wiseclean DAIHAN, WUC-AO3H, Kore), hassas terazi (Citizen Scale, CX 220), ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (IKA RH Basic 2 ve Magnetic Stirrer, MSH 300), mikropipetler (10 µL, 20 µL, 1000 µL, Eppendorff), pH metre (WTW ProfiLine pH 3310), derin dondurucu (Vestel, -20°C), buzdolabı (Arçelik, ev tipi), dış sirkülasyonlu su banyosu (Nuve BM 302) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Grafit tozu, jelatin, mineral yağ, gallik asit, asetik asit, sodyum bisülfit, sodyum benzoat, glukoz ve askorbik asit Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)'dan; KCl, potasyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, etanol (% 99,9 saflıkta), sodyum asetat, benzoik asit Merck KGaA (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlandı.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. Tampon Çözeltileri

50 mM Fosfat tampon çözeltisi: 3,549 g Na_2HPO_4 tartılarak, destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. 3,4015 g KH_2PO_4 tartılarak destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden belirli oranlarda karıştırılarak pH değeri 6,0-8,0 aralığındaki değerlerde fosfat tampon çözeltileri elde edildi.

0,1 M Sodyum asetat tampon çözeltisi: 0,82 g $C_2H_3O_2Na$ tartılıp saf suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanarak, 0,1 M sodyum asetat stok çözeltisi hazırlandı. 0,57 mL CH_3COOH saf suyla 100 mL'ye tamamlanarak, 0,1 M stok asetik asit çözeltisi hazırlandı. Elde edilen stok çözeltilerin belirli oranlarda karıştırılması ile pH 4,0-5,5 değerleri arasında tampon çözeltileri elde edildi.

Tampon çözeltiler buzdolabında +4°C'de saklandı.

3.1.3.2. Enzim Çözeltisi

Ticari olarak mevcut *T. versicolor* lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2) (13,6 U/mg) Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)'dan temin edilerek kullanıldı. Çalışmada kullanılacak enzim çözeltileri, ultra saf suda 5,0 U/5,0 µL'lik porsiyonlar halinde hazırlandı. Hazırlanan enzim porsiyonları, derin dondurucuda -20°C'de depolandı.

3.1.3.3. Substrat Çözeltisi

2 mM Gallik asit çözeltisi: Fenolik bileşik modeli olarak belirlenen gallik asit çözeltisinin hazırlanması için, 3,4 mg gallik asit tartılıp saf suda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti, stok gallik asit çözeltisi olarak kullanıldı. Stok çözeltisi, her çalışma için günlük hazırlanarak koyu renk şişede bekletildi.

3.1.3.4. Girişime Neden Olabilecek Maddelerin Çözeltileri

- **30 mg/L Sodyum bisülfit çözeltisi:** 6 mg sodyum bisülfit tartılıp 50 mM pH 6,0 fosfat tamponunda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.
- **% 0,2 (w/v) Sodyum benzoat çözeltisi:** 400 mg sodyum benzoat tartılıp 50 mM pH 6,0 fosfat tamponunda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

- **% 0,015 (w/v) Benzoik asit çözeltisi:** 30 mg benzoik asit tartılıp 50 mM pH 6,0 fosfat tamponunda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.
- **2 mg/L Askorbik asit çözeltisi:** 0,4 mg askorbik asit tartılıp 50 mM pH 6,0 fosfat tamponunda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.
- **100 µM Glukoz çözeltisi:** 3,6 mg glukoz tartılıp 50 mM pH 6,0 fosfat tamponunda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma Elektrodunun Temizlenmesi

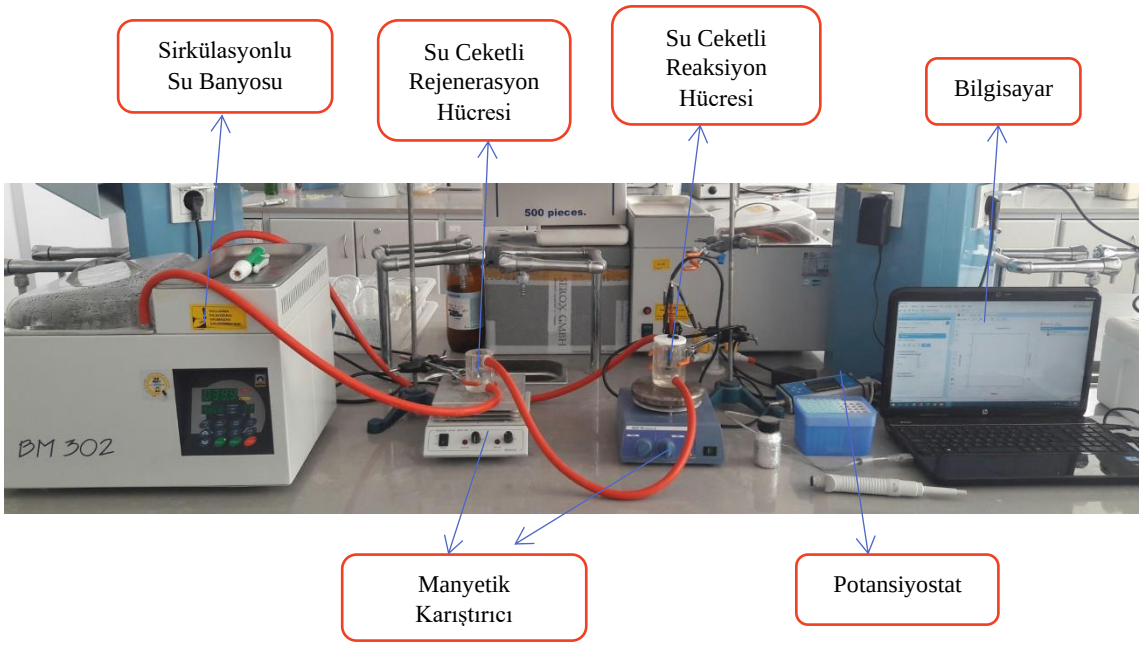
Çalışma elektrodu temizleme işlemi için; elektrot, sırasıyla, saf etanol ve saf su ile 10'ar dk ultrasonik su banyosunda bekletildi. Ardından, bol saf suyla yıkanarak % 99,99 saflıktaki argon gazıyla kurutuldu. Ölçümler tamamlandığında, çalışma elektrodundaki biyoaktif tabaka kürdan yardımıyla temizlenerek elektrot yine sırasıyla, saf etanol ve saf su ile 10'ar dk ultrasonik su banyosunda muamele edildi. Bol saf su ile yıkanarak argon gazı ile kurutma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.2. Lakkaz Temelli Biyosensörün Hazırlanması

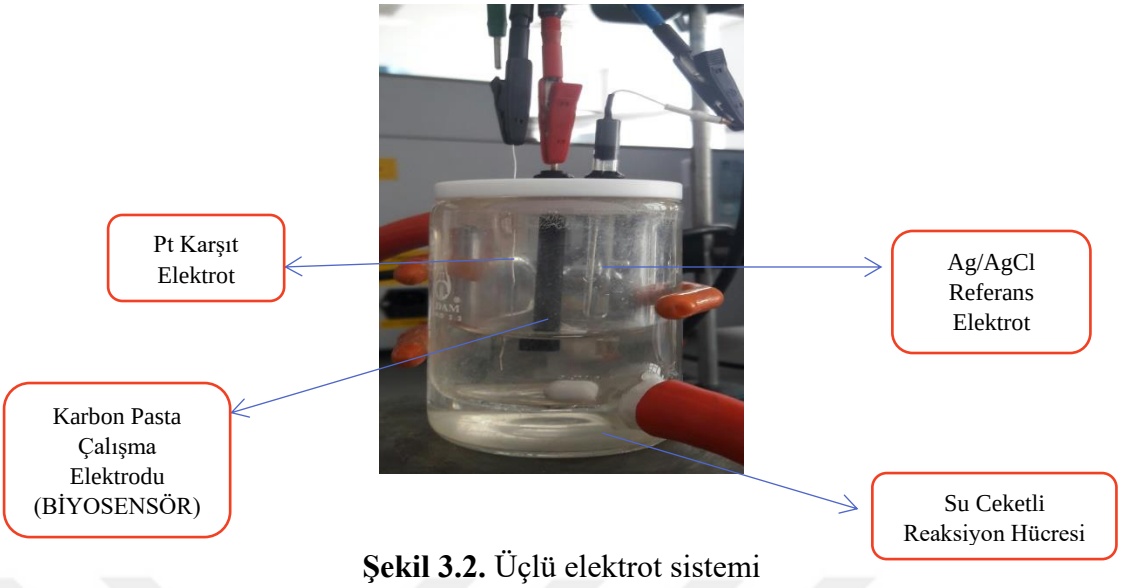
Geliştirilen biyosensörün biyoaktif tabakasını oluşturan karbon pasta homojenatının hazırlanması için, saat camında spatül yardımıyla homojenize edilen 18 mg grafit tozuna, 2,0 mg jelatin, 5,0 U'lik enzim aktivitesine sahip 5,0 µL *T. versicolor* lakkaz çözeltisi eklendi ve tekrar spatül ile karıştırılarak homojenize edildi. Homojenata 6,5 mg mineral yağ eklendi ve homojenizasyon işlemi tekrar edildi. Her bir homojenizasyon işlemi 15'er dk'lık sürelerde gerçekleştirildi. Son aşamada, elde edilen biyoaktif tabaka, temizlenen çalışma elektroduna dolduruldu ve biyosensör 30 dk boyunca karanlıkta, oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinin sonunda, 10 dk sinterleme işlemi gerçekleştirilerek biyoaktif tabakanın pürüzsüz hale getirilmesi sağlandı. Saf suyla yıkanan elektrot, her ölçümden önce 5 dk boyunca çalışma koşullarında rejenere edildi.

3.2.3. Lakkaz Temelli Biyosensörün Ölçüm Prosedürü

Hazırlanan lakkaz temelli biyosensör ile yapılacak ölçümler, amperometrik ölçüm prensibine uygun olarak gerçekleştirildi. Ölçümler için Şekil 3.1'de verilen düzenek hazırlandı. Su banyosunun sıcaklığı 25°C olarak ayarlandı. Reaksiyonun gerçekleşeceği su ceketli reaksiyon hücresine 20 mL 0,1 M asetat tamponu, pH 5,0 konuldu. Karbon pasta çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans ve Pt karşıt elektrotlarından oluşan üçlü elektrot sistemi reaksiyon hücresine yerleştirildi (Şekil 3.2). Manyetik karıştırıcı yardımıyla reaksiyon hücresi için sabit bir karıştırma hızı ayarlandıktan sonra, PalmSens3® potansiyostat açıldı ve devre için potansiyel fark +0,7 V olarak sabitlendi. Ölçümlerin başında, devreden geçen akımın dengelenmesi beklendikten sonra reaksiyon hücresine belirli derişimde stok gallik asit çözeltisinden eklendi. Amperometrik ölçümlerde, elektrot yüzeyinde meydana gelen enzimatik reaksiyon sırasında lakkaz, ortamdaki substrat derişimi ile orantılı olmak üzere serbest oksijeni kullanır ve harcanan oksijen miktarıyla birlikte devreden geçen akım miktarı da değişir. Buna bağlı olarak reaksiyon tamamlandığında, azalan oksijen miktarı nedeniyle gerçekleşen sistemdeki akım değişiminin tekrar dengeye gelmesi beklendi ve akım sabitlendikten sonra devreden geçen akım miktarı kaydedildi.



Şekil 3.1. Lakkaz temelli biyosensör ile yapılan amperometrik ölçümlerde kullanılan düzenek



Şekil 3.2. Üçlü elektrot sistemi

3.3. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

3.3.1. pH Optimizasyonu

Lakkaz temelli biyosensörün, gallik asite karşı en yüksek cevabı verdiği pH değerini belirlemek için farklı pH değerlerine sahip 0,1 M sodyum asetat (pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5) ve 50 mM fosfat (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) tamponları hazırlandı. Amperometrik ölçümler, Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı şekilde, 25°C'de +0,7 V'luk sabit bir potansiyel uygulanarak gerçekleştirildi. Farklı pH değerlerinde, reaksiyon ortamındaki derişimi 2,5 µM olacak şekilde eklenen gallik asit için gerçekleştirilen her bir ölçümden önce biyosensör, kullanılacak tampon içerisinde 5'er dk rejenere edildi. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda, çalışılan pH değerleri ve biyosensörün verdiği cevaplara göre çizilen Bağıl Aktivite (%)-pH grafiğine göre optimum pH değeri belirlendi.

3.3.2. Sıcaklık Optimizasyonu

Lakkaz temelli biyosensörün, gallik asit için en iyi cevabı verdiği sıcaklığın belirlenmesi amacıyla, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50°C'de 2,5 µM gallik asit için amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Farklı sıcaklıklarda ölçümler gerçekleştirilmeden önce hazırlanan biyosensör her bir çalışma sıcaklığında, 50 mM fosfat tamponunda (pH 6,0), 5 dk boyunca rejenere edildi. Yapılan amperometrik

ölçümler sonrasında, biyosensörün optimum sıcaklık değeri, çizilen Bağıl aktivite (%)-Sıcaklık grafiğine göre belirlendi.

3.4. Lakkaz Temelli Biyosensör için İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi

3.4.1. Enzim Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

Geliştirilen biyosensörün biyoaktif tabakasına immobilize edilen lakkaz miktarının biyosensör cevabına etkisini incelemek için, 5,0 µL'si 1,0 U, 1,25 U, 2,5 U, 5,0 U enzim aktivitesine sahip lakkaz çözeltileri kullanılarak dört biyosensör hazırlandı. Diğer immobilizasyon koşulları sabit tutuldu. Hazırlanan biyosensörlerle, standart fenolik bileşik olarak kullanılan gallik asit için, belirlenen optimum koşullarda (50 mM fosfat tamponu, pH 6,0 ve 40°C) amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Her bir biyosensör için, reaksiyon ortamında bulunan farklı gallik asit derişimlerine karşı (5-100 µM) biyosensör tarafından ölçülen akım değişimlerinin ΔI (nA), grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon grafikleri elde edildi. Grafikten, her bir değer için doğru denklemleri ve R^2 değerleri hesaplandı.

3.4.2. Jelatin Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

Biyosensör için biyoaktif tabakanın hazırlanması aşamasında, *T. versicolor* lakkazının immobilizasyonu için tutuklama matriksi olarak kullanılan jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi incelendi. Biyoaktif tabaka olarak hazırlanan ve elektrota doldurulacak olan pasta homojenatının kütlesi (26,5 mg) sabit tutulmak koşulu ile 1,0, 2,0 ve 3,0 mg jelatin değerleri ile çalışıldı. Hazırlanan üç biyosensör ile belirlenen optimum koşullarda (50 mM fosfat tamponu, pH 6,0; 40°C; 1,25 U/5,0 µL lakkaz miktarı) amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Her bir biyosensör için elde edilen akım değişimleri ΔI (nA) ile gallik asit derişimleri (5-100 µM) arasında doğru grafikleri çizildi. Kalibrasyon grafiğinden, doğru denklemleri ve R^2 değerleri hesaplandı.

3.5. Biyosensör için Karakterizasyon Çalışmaları

3.5.1. Lakkaz Temelli Biyosensörün Döngüsel Voltamogramı

Optimize edilen koşullarda hazırlanan lakkaz temelli biyosensör ile 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) ve 40°C sıcaklıkta, (-1,0)-(1,0) V potansiyel aralığında, 0,05

V/s tarama hızında CV yöntemi ile voltametrik ölçümler alındı. Artan derişimlerde eklenen gallik asit çözeltileri için elde edilen ölçüm sonuçları, gallik asit eklenmeksizin yapılan ölçümlerin sonuçları ile karşılaştırıldı.

3.5.2. Gallik Asit için Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi

Lakkaz temelli biyosensör ile standart fenolik bileşik olarak belirlenen gallik asitin 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10, 25, 50, 75, 100 ve 200 μM derişimleri için optimize edilen koşullarda (50 mM fosfat tamponu, pH 6,0, 40°C ve +0,7 V sabit potansiyel) amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Kalibrasyon grafiği, reaksiyon ortamına eklenen gallik asit derişimlerine karşı (μM) biyosensörün ölçtüğü akım değişimlerinin, ΔI (nA), grafiğe geçirilmesi ile elde edildi. Grafikten elde edilen doğrunun eğimi ve R^2 değeri hesaplanarak biyosensör için doğrusal tayin aralığı belirlendi.

3.5.3. Lakkaz Temelli Biyosensörün Cevap Süresinin Belirlenmesi

Lakkaz temelli biyosensörün cevap süresinin belirlenmesi için, doğrusal tayin aralığı sonuçlarına bağlı olarak 0,5-100 μM arası derişimlerde hazırlanan gallik asit çözeltileri ile ölçümler gerçekleştirildi. Gallik asitin reaksiyon ortamına eklenmesi ve reaksiyonun sonlanması ile devreden geçen akım farkı değişiminin tekrar dengelendiği zaman aralığı (s), hazırlanan biyosensörün cevap süresi olarak kabul edildi.

3.5.4. Lakkaz Temelli Biyosensörün Tayin Sınırının (LOD) Belirlenmesi

Lakkaz temelli biyosensör ile tespit edilecek en düşük gallik asit derişimini temsil eden tayin sınırını (LOD) belirlemek için, farklı günlerde hazırlanan biyosensörler ile 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0), 40°C, +0,7 V'luk sabit potansiyel değerlerinde, gallik asit için belirlenen doğrusal tayin aralığında ölçümler gerçekleştirildi. Elde edilen biyosensör cevaplarına karşılık gelen gallik asit miktarları (μM), Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı şekilde elde edilen grafiğin doğru denklemi ile hesaplandı. Hesaplanan sonuçların standart sapma değeri (S.S) ve grafiğin doğru denklemindeki eğim (m) değeri, [(3xS.S.)/m] formülünde yerine konularak LOD elde edildi. Hesaplamalarda, Microsoft Excel® yazılımı kullanıldı (Shrivastava & Gupta, 2011; Uhrovčík, 2014).

3.5.5. Lakkaz Temelli Biyosensör için Tekrarlanabilirlik Çalışması

Lakkaz temelli biyosensörün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla, gün içinde hazırlanan bir biyosensör ile, optimum çalışma koşulları sağlanarak (50 mM fosfat tamponu, pH 6,0, 40°C) sabit potansiyelde amperometrik 10 ölçüm alındı. Ölçümler için reaksiyon ortamına 20'şer mL gallik asit eklendi. Bulunan sonuçlar ve elde edilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak, ortalama değer ($\bar{X}$), standart sapma (±S.S.) ve varyasyon katsayısı (% V.K.) belirlendi.

3.5.6. Lakkaz Temelli Biyosensör için Girişime Neden Olabilecek Maddelerin Etkisinin Belirlenmesi

Geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün gıdalarda yapılacak fenolik madde analizleri için spesifik olup olmadığını belirlemek amacıyla, girişime neden olabilecek maddelerin ölçümlere etkisi çalışıldı. Gıdalarda koruyucu ve asidik düzenleyici maddeler olarak kullanılan bazı girişime neden olabilecek maddelerin çalışma tamponunda hazırlanan çözeltilerinin (30 mg/L sodyum bisülfit, % 0,2 (w/v) sodyum benzoat, % 0,015 (w/v) benzoik asit, 100 µM glukoz ve 2 mg/L askorbik asit) her biri varlığında 25 µM gallik asit için biyosensör cevapları incelendi. Ölçüm prosedürüne bağlı kalarak, gerçekleştirilen ölçümler arasında, çalışma elektrodu bol saf suyla yıkanarak 15 dk boyunca reaksiyon koşullarında rejenere edildi. Biyosensörün, girişime neden olabilecek maddeler eklenmeksizin, 25 µM gallik asit için gösterdiği akım değişimi % 100 kabul edilerek girişime neden olabilecek maddeler varlığında elde edilen akım değişimleriyle karşılaştırıldı.

3.5.7. Lakkaz Temelli Biyosensörün Depo Kararlılığı

Lakkaz temelli biyosensörün depo kararlılığını incelemek amacıyla, 30 gün boyunca 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) içerisinde oda koşullarında ve karanlıkta depolanan biyosensörün, belirli aralıklarla 10 µM gallik asit için verdiği cevaplar belirlendi. Depolama süresi boyunca her bir ölçüm için bağıl aktivite (%) değerleri, biyosensör ile elde edilen en yüksek aktivite değeri % 100 olarak kabul edilerek hesaplandı.

3.6. Gerçek Örnek Analizi

Geliştirilen amperometrik biyosensör ile bu çalışmada belirlenen optimum koşullarda ev yapımı hardaliye ve ev yapımı şarap için toplam fenolik madde içeriğinin ölçümü gerçekleştirildi. Örneklerdeki toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi için, standart fenolik bileşik olarak kullanılan gallik asit çözeltisi (5-100 µM) ile oluşturulan kalibrasyon grafiklerine karşılık gelen amperometrik sinyallerin interpolasyonu gerçekleştirildi.

Optimum koşullarda hazırlanan biyosensör, 20 mL, 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) içeren elektrokimyasal hücreye daldırıldı ve 40°C'de sürekli manyetik karıştırma altında +0,7 V'luk bir potansiyel uygulandı. Kararlı ve sabit akım değerine ulaşıldığında, hardaliye ve şarap örneklerinden ayrı ayrı 1000'er µL elektrokimyasal hücreye eklendi ve akım değişimi kaydedildi. Elde edilen akım değişimi, daha önce gallik asit stok çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon grafiğine interpole edildi ve gallik asit eşdeğer derişim değerine göre toplam fenolik madde içeriği hesaplandı. Karşılaştırma amacıyla, ev yapımı hardaliye ve şarap ayrıca LC-MS/MS kullanımını içeren kromatografik yöntemle analiz edildi.

BÖLÜM 4

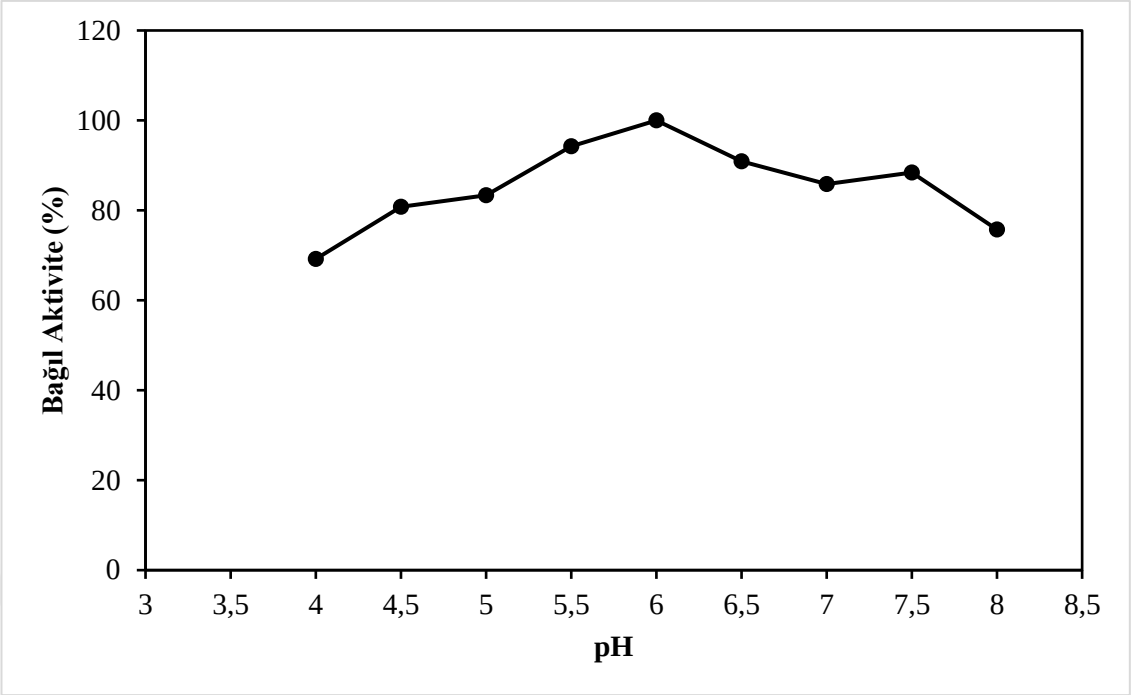
SONUÇ ve TARTIŞMA

4.1. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

4.1.1. pH Optimizasyonu

Enzim biyosensörlerinin cevabını, ortam pH'ına göre hem enzim aktivitesi hem de substratın difüzyon hızındaki değişimlerin etkilediği bilinmektedir (Prideaux, 1931). Bu çalışmada, biyosensörün biyoaktif tabakasında immobilize edilen lakkaz ile fenolik bileşik modeli olarak seçilen gallik asit arasındaki yükseltgenme-indirgenme reaksiyonunun ortam pH'ına bağımlılığını incelemek için; pH 4,0-8,0 aralığındaki hazırlanan tampon çözeltilerde (0,1 M asetat tamponu, pH 4,0-4,5-5,0-5,5; 50 mM fosfat tamponu, 6,0-6,5-7,0-7,5-8,0) biyosensörün 2,5 μM gallik asit çözeltisi için verdiği cevaplar ölçüldü. Elde edilen cevaplar, Bağıl Aktivite-pH grafiğine geçirildi (Şekil 4.1).

Şekil 4.1 incelendiğinde, biyosensörün pH değişimine karşı geniş bir aralıkta kararlı olduğu ve gallik asite karşı aktivitesini kaybetmediği görülmektedir. İmmobilize lakkazın aktivitesine bağlı olarak, pH 5,5 ila 6,5 aralığında biyosensörün verdiği cevaplar birbirine oldukça yakındır. Ayrıca, ortam pH'ı daha asidik ve daha bazik bölgelere kaydırıldığında cevapta bir miktar düşüş gözlenmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, biyosensör için optimum pH 6,0 olarak kabul edilerek bundan sonraki tüm çalışmalar 50 mM fosfat tamponu, pH 6,0'da gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Biyosensör cevabına pH değerinin etkisi; reaksiyon ortamındaki gallik asit çözeltileri (2,5 µM) için 25°C'de, +0,7 V'da alınan amperometrik ölçümlere göre hesaplanan değerler

Literatürde, serbest mantar lakkazları için optimum pH değeri aralığı genellikle asidik bölgede, 3,5-6,0 aralığındadır. Ancak bu değer aralığı, substrata bağlı olarak 2,7 ila 7,5 değerlerine kadar genişleyebilmektedir (Call & Mucke, 1997; Gianfreda, Xu & Bollag, 1999).

T. versicolor lakkaz temelli biyosensörlerin farklı fenolik bileşik tayinleri için en iyi aktivite gösterdiği pH değerleri 4,5 ila 6,0 arasında değişmektedir (ElKaoutit vd., 2008; Eremia vd., 2013; Garcia vd., 2015; Ibarra vd., 2010; Montereali vd., 2010; Portaccio vd., 2006; Roy vd., 2005).

Çalışmamızda, hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakasında bulunan jelatin matriksine tutuklu *T. versicolor* lakkazı için belirlenen optimum pH'ının bir miktar nötr değerlere doğru kaydığı görülmektedir. İmmobilize enzimler için optimum pH değerindeki kayma, genellikle immobilizasyon matriksinin proton değişim özelliklerine bağlı olması ile açıklanmaktadır. Jelatin gibi protein yapılı biyopolimerler, izoelektrik nokta (pI) değerleri nedeniyle ortamın pH değerine bağlı olarak pozitif ya da negatif

elektriksel yükle yüklenebilmektedir (Cho vd., 2008). Bu durum, çalışmamızda lakkaz temelli biyosensör için optimum pH değerinin 6,0 olarak bulunmasını açıklamaktadır.

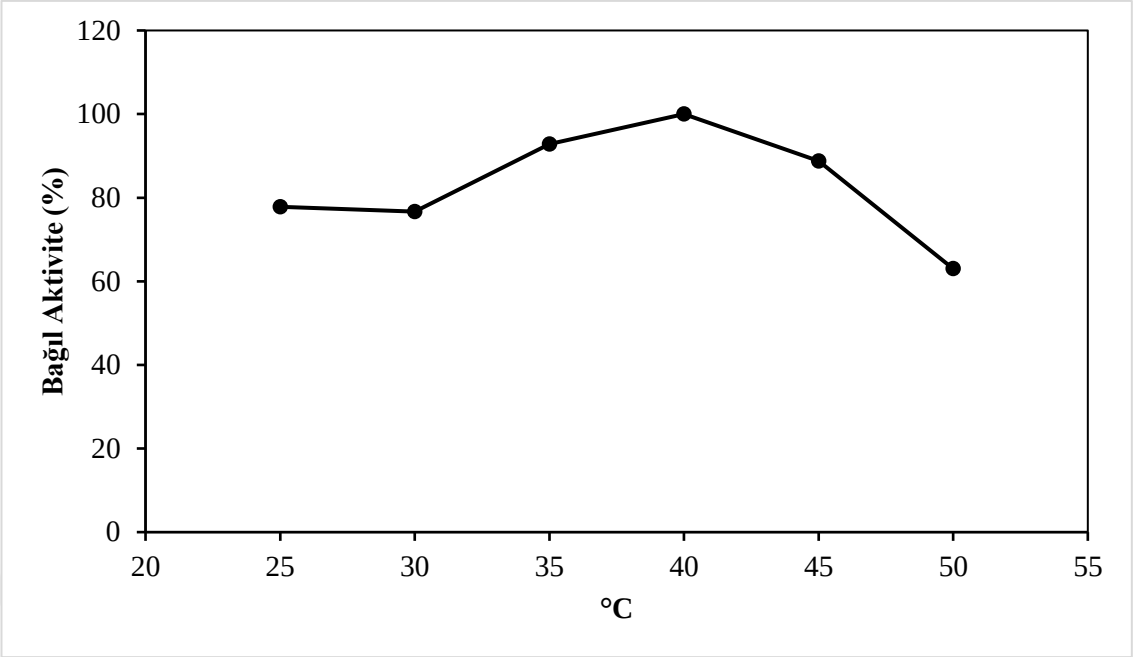
Garcia vd. (2015), antioksidan kapasitesi için geliştirdikleri *Pycnoporus sanguineus* lakkaz temelli amperometrik biyosensör ile pH 2,0-8,0 aralığında; Rawal vd. (2012), çay özlerinde fenolik içerik belirlemek için geliştirilen demir oksit nanoparçacık/karboksilatlı çok duvarlı karbon nanotüp/polianilin/Au elektrot üzerine immobilize edilen *Ganoderma* sp. lakkaz temelli amperometrik biyosensör ile pH 3,0-7,0 aralığında; Montereali vd. (2010), screen-printed grafit elektrot üzerinde ferrosene tutuklama yöntemi ile immobilize edilen lakkaz-tirozinaz temelli amperometrik biyosensör için pH 5,1-6,5 aralığında yaptıkları optimizasyon çalışmalarında, optimum pH değerini 0,1 M fosfat tamponu, pH 6,0 olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmalara bağlı olarak lakkaz temelli amperometrik biyosensörün optimum pH değerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

4.1.2. Sıcaklık Optimizasyonu

Enzimlerin katalitik aktivitelerini etkilemesinden dolayı biyosensör cevabını etkileyen diğer çevre koşulu sıcaklıktır. Sıcaklık, enzimin aktivitesi yanında enzimin immobilize edildiği tabakanın davranışlarını ve buna bağlı olarak biyosensörün aktif tabakasının difüzyon özelliklerini de etkilemektedir.

Lakkaz temelli biyosensörün optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi için, 25-50°C arasındaki sıcaklık değerlerinde düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru geliştirilen biyosensör ile amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. 2,5 µM gallik asit için biyosensör cevabı, 50 mM fosfat tamponu, pH 6,0 ortamında izlendi. Elde edilen en iyi cevap değeri % 100 kabul edilerek, Bağıl aktivite (%)-Sıcaklık grafiği çizildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Biyosensör cevabına sıcaklık değerinin etkisi; 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) içeren reaksiyon ortamına eklenen gallik asit çözeltileri (2,5 µM) için +0,7 V'da alınan amperometrik ölçümlere göre hesaplanan değerler

Şekil 4.2 incelendiğinde, biyoaktif tabakada bulunan immobilize enzimin çalışılan sıcaklık aralığında elde edilen en yüksek biyosensör cevabının 40°C'de elde edildiği daha yüksek sıcaklıklarda ise cevabın azaldığı görülmektedir. Lakkazlar genellikle 30-50°C sıcaklık aralığında kararlıdırlar ve 60°C sıcaklık üzerindeki değerlerde enzimatik aktivitelerini hızlıca kaybederler (Chefetz, Chen & Hadar, 1998; Galhaup, Goller, Peterbauer, Strauss & Haltrich, 2002; Jung, Xu & Li, 2002; Palonen, Saloheimo, Viikari & Kruus, 2003; Wood, 1980; Xu vd., 1996). Daha yüksek sıcaklıkta enzimin denatüre olması ya da immobilizasyon matriksinin bozunması nedeniyle katalitik aktivitenin düştüğü söylenebilir.

Jelatin, belirli sıcaklıktaki şişme kabiliyeti nedeniyle uygun bir hidrofilik ağ oluşturarak lakkaz gibi biyomoleküllerin tutuklama yöntemiyle immobilizasyonu için destek olarak kullanılmaktadır. Hazırlanan jelatin çözeltisinin şişme davranışı göstererek jelleşmesi çok kısa bir sıcaklık aralığında gerçekleşir ve oluşan jel sıcaklık değişimine bağlı olarak tekrar çözelti haline dönebilmektedir. 40°C ve daha yüksek sıcaklıklarda jelatinin stabilitesini kaybettiği ve bu nedenle eriyerek reaksiyon ortamında çözüldüğü bildirilmektedir (Vakıl-Nasliyan, 2012).

Çalışmada geliştirilen biyosensör için en yüksek biyosensör cevabının 40°C'de gözlenmesi ve bu sıcaklık değerinin, jelatinin oluşturduğu hidrofilik ağ yapısı için kritik bir sıcaklık olması nedeniyle, hazırlanan biyosensör ile 2,5 µM gallik asit için art arda 7 ölçüm alınarak biyoaktif tabakadaki jelatinin kararlılığı test edildi. Her ölçüm arasında, elektrodun 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) ve 40°C sıcaklıkta, 5 dk rejenerasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre (Çizelge 4.1) % V.K. 4,24 olarak hesaplandı.

Çizelge 4.1. Lakkaz immobilizasyonunda tutuklama ajanı olarak kullanılan jelatin matriksinin kararlılığının belirlenmesi için, biyosensör ile optimum çalışma koşullarında (50 mM fosfat tamponu, pH 6,0; 40°C) art arda gerçekleştirilen amperometrik ölçüm sonuçları

Ölçüm sayısı	Akım Değişimi (ΔA)
1	508
2	518
3	565
4	553
5	544
6	570
7	540

*Ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (±S.S.) 542,57 ±22,99 nA ve varyasyon katsayısı (% V.K.) 4,24 olarak hesaplanmıştır.

Varyasyon katsayısının kabul edilebilir değerler arasında olmasından dolayı biyosensör ile 40°C'de yapılacak ölçümler için biyoaktif tabakadaki jelatinin hidrofilik ağ yapısının kararlı kaldığı sonucuna varıldı. Tüm bu sonuçlara göre, lakkaz temelli biyosensör için optimum sıcaklığın 40°C olmasına karar verildi.

Sarika, Rekha & Narasimha-Murthy (2016), Clark tipi oksijen elektrodu kullanarak geliştirdikleri amperometrik biyosensörde, 5,0 U *T. versicolor* lakkazını 2,5 mg jelatin ile karıştırarak naylon membran yüzeyine tutuklamışlardır. 0,2 M fosfat tamponu (pH 6,8), 30-70°C sıcaklık aralığında 2,6-dimetoksifenol için yaptıkları amperometrik ölçümler sonrasında optimum sıcaklık değerini 45°C olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.

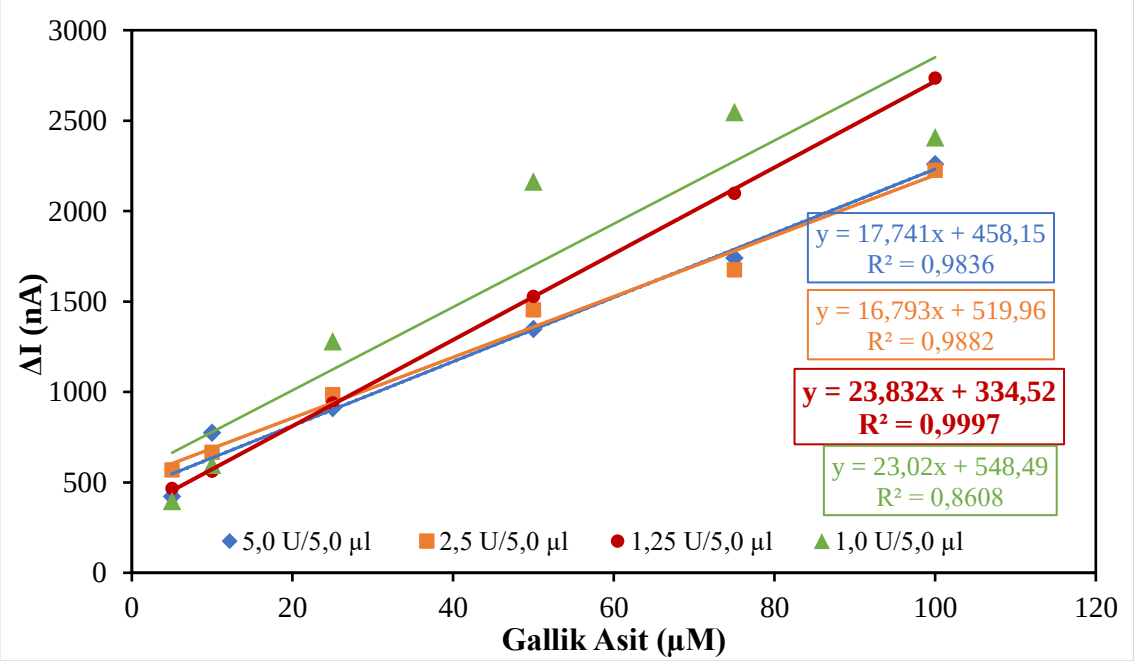
Bu çalışmalara bağlı olarak lakkaz temelli amperometrik biyosensörün optimum sıcaklık değerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Lakkaz temelli amperometrik biyosensör için optimum çalışma koşulları; 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) ve 40°C olarak belirlendi ve bundan sonraki çalışmalarda bu koşullara bağlı olarak ölçümler gerçekleştirildi.

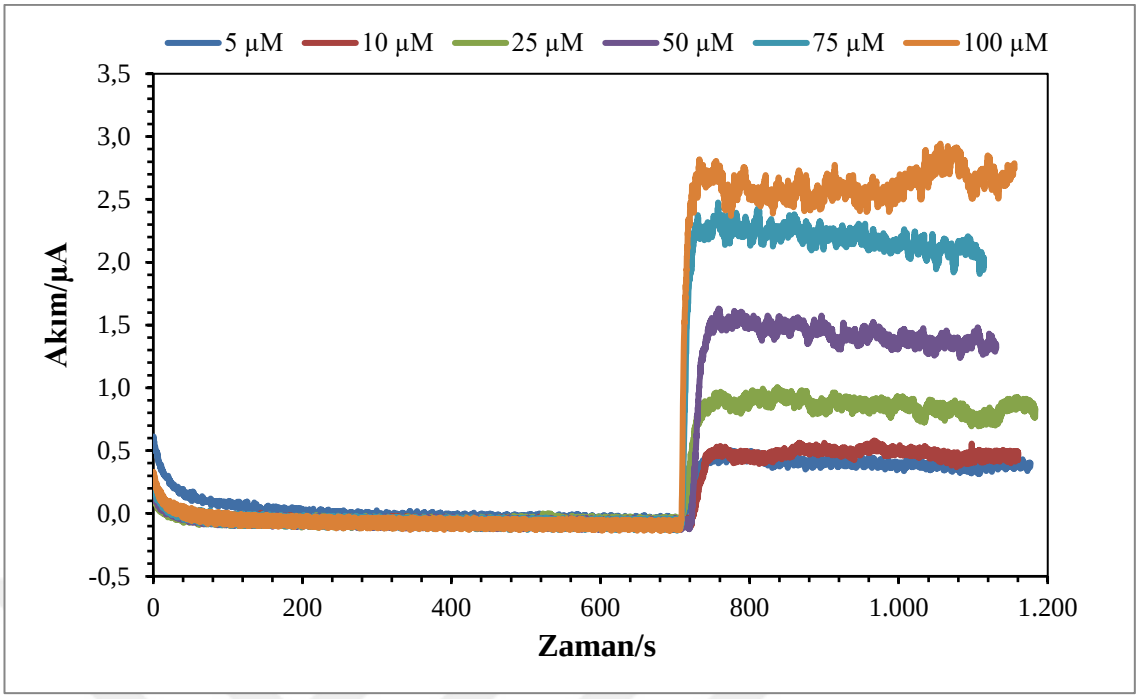
4.2. Lakkaz Temelli Biyosensör için İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi

4.2.1. Enzim Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

Enzim biyosensörünün performansı, biyosensör duyarlılığını doğrudan etkileyen immobilize enzim miktarına bağlıdır. Bu etkiyi incelemek için, 1,0 U, 1,25 U, 2,5 U ve 5,0 U lakkaz aktivitesine sahip 5,0 µL'lik enzim çözeltileri ile elektrotlar hazırlandı ve her bir biyosensör ile gallik asitin artan derişimlerine (5-100 µM) bağlı olarak amperometrik ölçümler yapıldı. Her bir biyosensör için ölçümlerden elde edilen akım değişimlerine göre kalibrasyon grafiği çizildi ve en iyi doğrusallığın elde edildiği immobilize enzim miktarını içeren biyosensör için Akım (µA)-Zaman (s) diyagramı verildi (Şekil 4.3. (a) ve (b)).



Şekil 4.3. (a) Biyoaktif tabakadaki immobilize lakkaz miktarının biyosensör cevabına etkisine ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.3. (b) Biyoaktif tabakadaki immobilize lakkaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi; 1,25 U/5,0 µL lakkaz kullanılarak hazırlanan biyosensörün 5-100 µM çalışma aralığındaki değişen gallik asit derişimlerine karşı +0,7 V'da verdiği cevaplar

Kalibrasyon grafiği incelendiğinde, 1,25 U/5,0 µL enzim aktiviteli lakkaz çözeltisi ile hazırlanan biyosensörün doğru denkleminin y=23,832x+334,52 olduğu ve en yüksek doğrusallığın (R^2= 0,9997) bu değer için hesaplandığı görülmektedir ve Şekil 4.3. (b), 1,25 U/5,0 µL enzim kullanılarak hazırlanan biyosensör ile gallik asitin artan derişimine bağlı olarak (5-100 µM çalışma aralığında) elde edilen akım değişimlerindeki artışı, açıkça vermektedir.

5,0 U/5,0 µL ve 2,5 U/5,0 µL lakkaz içeren biyosensörler için elde edilen doğru denklemleri sırasıyla y=17,741x+458,15 (R^2=0,9836) ve y=16,793x+519,96 (R^2=0,9882)'dır. Elde edilen değerler incelendiğinde, çalışmada kullanılan immobilize enzim miktarı arttıkça biyosensör cevaplarının düştüğü ve doğrusallığın azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni olarak, immobilize lakkaz miktarındaki artışın biyoaktif tabakada difüzyon sorunlarına neden olduğu söylenebilir.

Düşük lakkaz aktivitesi (1,0 U/5,0 µL) ile hazırlanan biyosensör için elde edilen değerler incelendiğinde ise, cevapların yüksek olmasına rağmen elde edilen doğru

denkleminin y=23,02x+548,49 ve doğrunun R^2 değerinin de 0,8608 olduğu görülmektedir. R^2 değerinin düşük olmasının nedeni, daha az enzim miktarının matriksteki çapraz bağların gevşemesine neden olması ve bu nedenle difüzyonun kolaylaşması ve dolayısıyla biyoaktif tabakadan substrat kaçışın olası olmasıyla açıklanabilir (De Wael vd., 2010; De Wael vd., 2012). Ayrıca, kullanılan enzim çözeltisinin aktivitesinin yetersiz olması nedeniyle, gallik asit için 5-100 µM çalışma aralığında substrat doygunluğunun meydana geldiği de kalibrasyon grafiğinden görülmektedir.

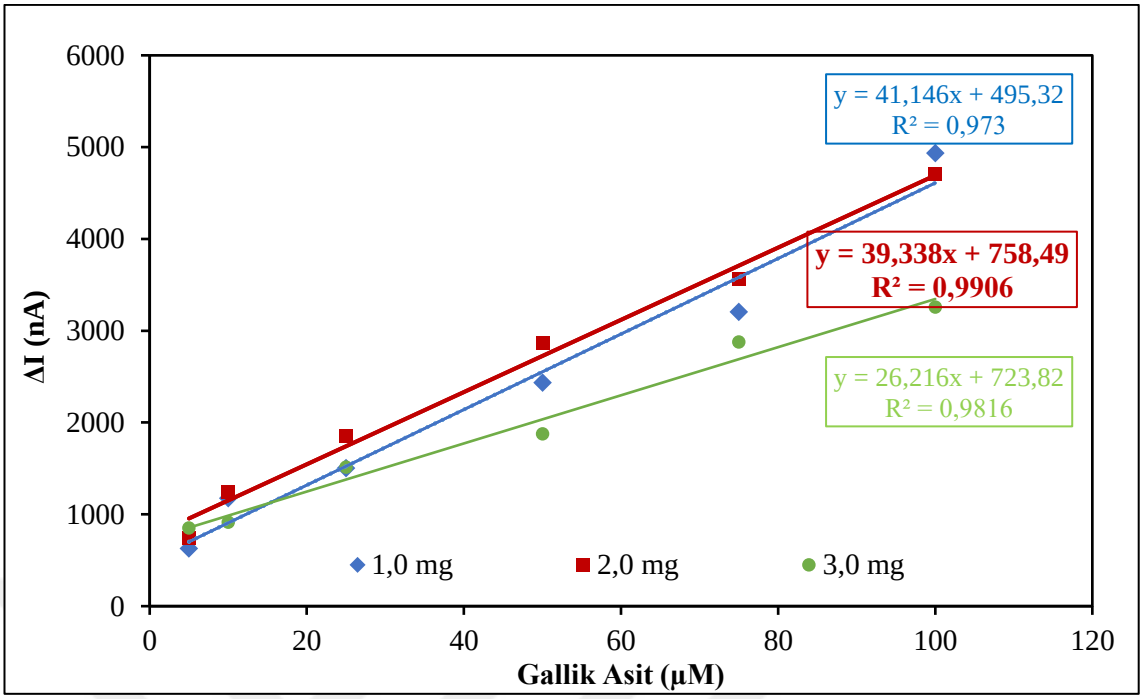
Bu sonuçlara göre, bundan sonraki çalışmalar için immobilize edilecek lakkaz miktarı 1,25 U/5,0 µL olarak seçildi.

Sarika, Rekha & Narasimhamurthy (2015), hazırladıkları lakkaz temelli amperometrik biyosensör ile 0,5-10 U aralığındaki enzim aktivitesi değerlerinde çalışmışlardır. 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,8) ve 45°C'de yaptıkları çalışma sonucunda immobilize edilecek lakkaz miktarını 2,0 U/20 µL olarak optimize ettiklerini bildirmişlerdir. Portaccio vd. (2013), hazırladıkları lakkaz temelli amperometrik biyosensör ile 0,05 M sitrat tamponu (pH 4,5) ve 25°C'de 0,59-6,52 U aralığındaki enzim aktivite değerleri için yaptıkları çalışma sonucunda immobilize edilecek lakkaz miktarını 1,19 U olarak rapor etmişlerdir.

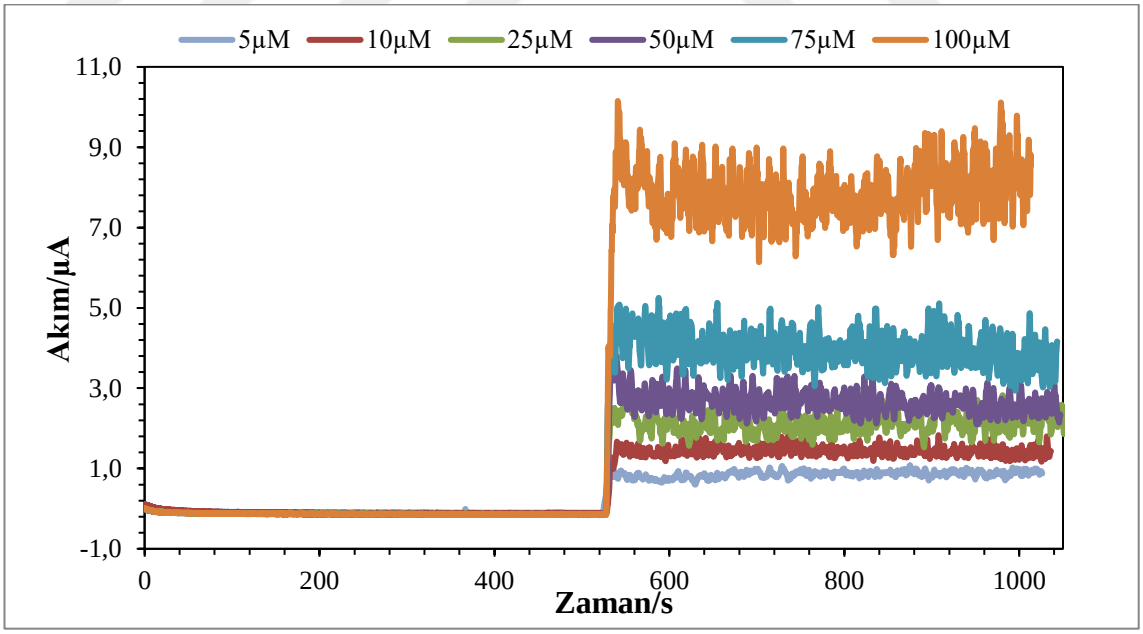
Bu çalışmalara bağlı olarak, lakkaz temelli amperometrik biyosensör geliştirilmesinde optimum lakkaz miktarının literatüre uygun olduğu görülmektedir.

4.2.2. Jelatin Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

Biyoaktif tabakada bulunan jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi için, sırasıyla, grafit tozu:jelatin:mineral yağ miktarı mg cinsinden 19:1,0:6,5; 18:2,0:6,5; 17:3,0:6,5 olacak şekilde hazırlanan biyosensörler ile amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Şekil 4.4. (a) ve (b)'de sırasıyla gallik asitin değişen derişimleri için (5-100 µM) elde edilen kalibrasyon grafiği ve en iyi biyosensör cevabının elde edildiği 2,0 mg jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensör cevaplarını gösteren grafik verilmektedir.



Şekil 4.4. (a) Biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisine ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.4. (b) Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi: 2,0 mg jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörün 5-100 µM çalışma aralığında değişen gallik asit derişimlerine karşı +0,7 V'da verdiği cevaplar

Biyoaktif tabakada 3,0 mg jelatin miktarı kullanılarak hazırlanan biyosensör için doğru denklemi ve R^2 değeri sırasıyla; y=26,216x+723,82; R^2=0,9816 olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.4. (a) incelenerek diğer sonuçlarla karşılaştırıldığında, biyosensör cevapları için doğrusallığın iyi olduğu ancak akım değişimlerinin düşük olduğu görülmektedir. Cevaplardaki düşüş, artan jelatin miktarına bağlı olarak sulu çözeltide oluşturduğu hidrofilik ağın sıkılaşması ve bu nedenle substrat, ürün ve ko-substrat gibi moleküllerin giriş-çıkışının engellenmesi olarak açıklanabilmektedir (De Wael vd., 2012).

1,0 mg jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensör ile yapılan ölçümler sonucunda, y=41,146x+495,32 (R^2=0,973) doğru denklemi elde edilmiştir. Çalışmadaki diğer biyosensörler ile karşılaştırıldığında, biyosensörün, doğrusal tayin aralığındaki en yüksek derişimli gallik asit çözeltisi (100 µM) için en yüksek cevabı verdiği ancak doğrusallığın diğer biyosensörlere göre daha düşük olduğu görülmektedir (R^2=0,973). Elde edilen yüksek cevap, kullanılan jelatin miktarının enzimin tutuklanması için yeterli olmaması ve enzimin art arda ölçümler sırasında sulu çözeltiye geçerek ortama eklenen substratla direkt tepkimeye girmesi ile açıklanabilir. Bu durumun tekrarlanabilirlik çalışmalarında da sorun yaratabileceği düşünülmektedir.

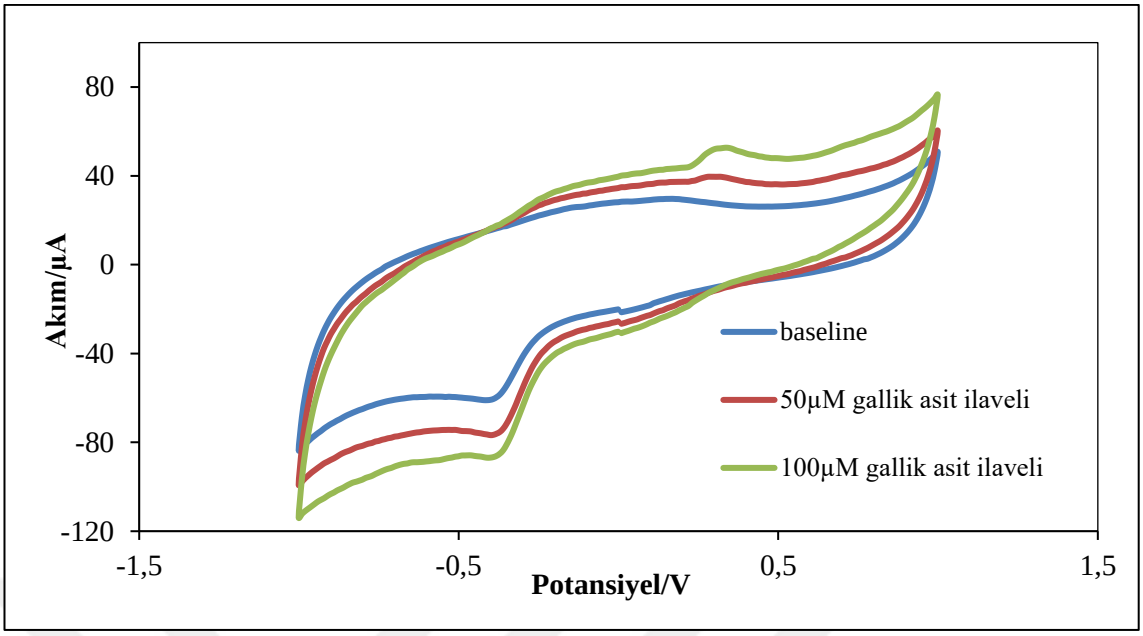
Timur vd. (2007), çalışmalarında karbon pasta elektrodunu hazırlamak için grafit tozu:jelatin:mineral yağ miktarını kütlece 17:2,0:6,5 mg:mg:mg olarak optimize ettiklerini bildirmişlerdir.

Elde edilen sonuçlara bağlı olarak, bundan sonraki çalışmalarda biyosensörün aktif tabakasının 1,25 U/5,0 µL lakkaz çözeltisi, 18 mg grafit tozu, 2,0 mg jelatin ve 6,5 mg mineral yağın birlikte homojenize edilerek hazırlanmasına karar verildi.

4.3. Biyosensör için Karakterizasyon Çalışmaları

4.3.1. Lakkaz Temelli Biyosensörün Döngüsel Voltamogramı

Tez kapsamında elde edilen optimum immobilizasyon koşullarına göre hazırlanan lakkaz temelli biyosensör için; 50 mM fosfat tamponu, pH 6,0 ve 40°C sıcaklıkta (-1,0)-(1,0) V arasında CV taramaları yapılarak biyosensörün artan gallik asit derişimine bağlı olarak döngüsel voltamogramlarındaki değişimler gözlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Lakkaz temelli biyosensör için gallik asit eklenmesi öncesi (baseline) ve sonrasında elde edilen döngüsel voltamogramlar: Ölçümler, 50 mM pH 6,0 fosfat tamponu çözeltisinde, 0,05 V/s tarama hızında, ±0,1 V potansiyel aralığında gerçekleştirildi.

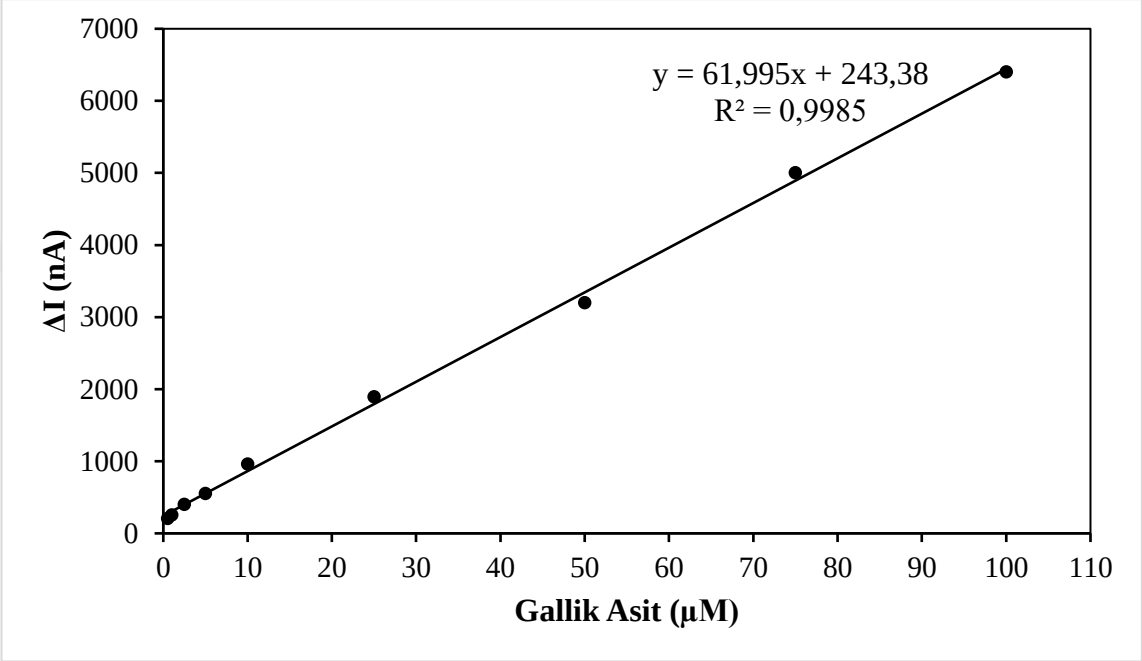
Şekil 4.5'teki döngüsel voltamogramlar incelendiğinde, reaksiyon ortamına eklenen gallik asit ile birlikte anodik pik oluşumu ve eklenen substratın artan derişimine uygun olarak hem katodik hem de anodik piklerde yükselmeler görülmektedir. Bu durum, lakkaz temelli biyosensörün ortamdaki gallik asite cevap verdiğini kanıtlamaktadır. Reaksiyon ortamına gallik asit eklenmesi ile ortamın elektrokimyasal aktifliği arttırmıştır (Roushani, Valipour & Valipour, 2016).

4.3.2. Gallik Asit için Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi

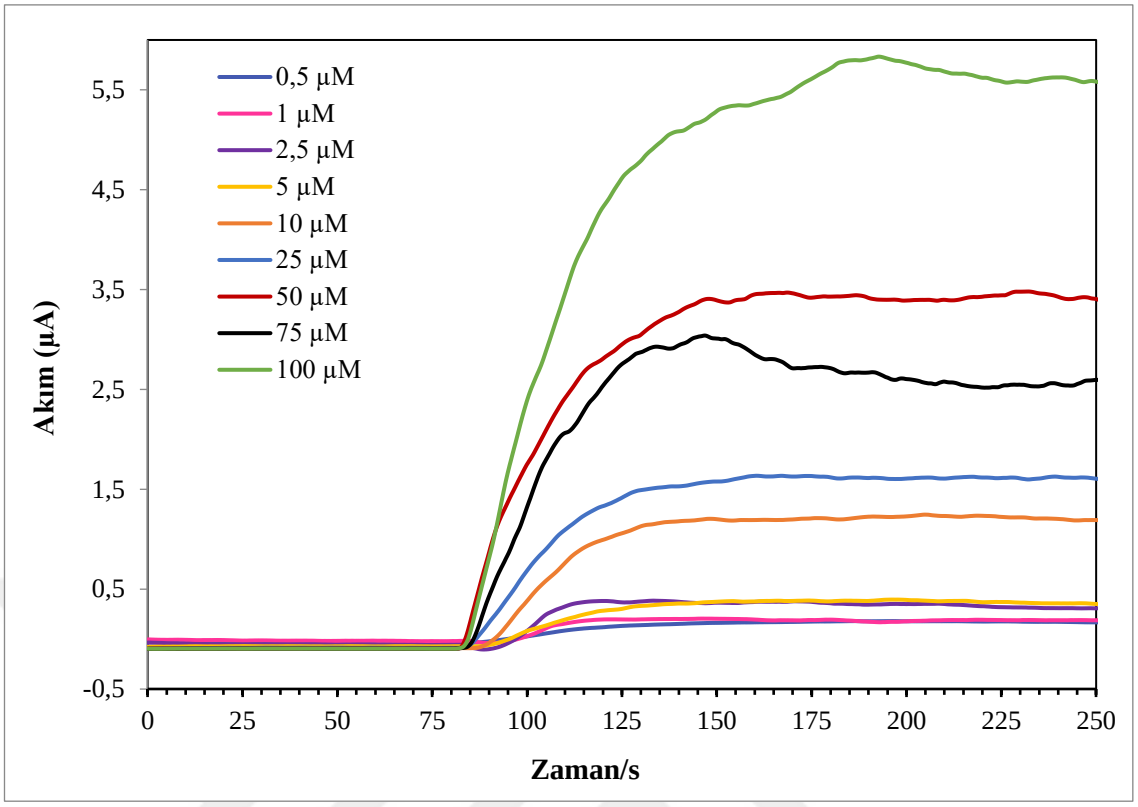
Biyosensörler ile gerçekleştirilen ölçümler için doğrusal tayin aralığı, belirli bir varyasyona bağlı olarak çalışılan substrat için elektrot duyarlılığının sabit olduğu derişim aralığı olarak tanımlanmaktadır. Biyosensör ile çalışılacak derişim değeri ya da değerleri, biyosensörün cevap verebileceği bu doğrusal derişim aralığında olmalıdır (Nejem, 2004).

Geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün doğrusal tayin aralığın belirlenmesi için, 0,5-200 µM derişim aralığındaki gallik asit çözeltileri ile optimum koşullarda

amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Şekil 4.6. (a) ve (b)'de sırasıyla, gallik asit derişimleri (x ekseni) ve her bir derişim için elde edilen akım farkları (y ekseni) kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği ve gerçekleştirilen amperometrik ölçümler sonucu her bir derişim için elde edilen zamana (s) bağlı akım değişimleri (nA) görülmektedir.



Şekil 4.6. (a) Lakkaz temelli biyosensörün kalibrasyon grafiği: 0,5-100 µM aralığında gallik asit derişimleri için 50 mM fosfat tamponu, pH 6,0; 40°C reaksiyon koşullarında +0,7 V'da amperometrik ölçümler gerçekleştirildi.



Şekil 4.6. (b) Lakkaz temelli biyosensörün 0,5-100 µM aralığında gallik asit derişimleri için 50 mM fosfat tamponu, pH 6,0; 40°C reaksiyon koşullarında +0,7 V'da verdiği cevaplar

Kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemi y=61,995x+243,38 ve R^2=0,9985 değeri ele alındığında doğrusallığın 0,5-100 µM çalışma aralığı için sağlandığı görülmektedir. 200 µM gallik asit ortama eklendiğinde biyoaktif tabakadaki immobilize lakkazın substrat için doygunluğa ulaştığı belirlenmiştir. Ayrıca, Şekil 4.6. (b), doğrusal tayin aralığı sınırları içerisinde, artan gallik asit derişimine bağlı olarak akım değişimlerinin de arttığını göstermektedir.

Bu çalışmaya göre, geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığı 0,5-100 µM ve doğrusallık katsayısı R^2=0,9985'dir. LOD değeri, Bölüm 3.5.4'te anlatıldığı şekilde hesaplanarak gallik asit için 0,1323 µM olarak bulundu.

4.3.3. Lakkaz Temelli Biyosensörün Cevap Süresinin Belirlenmesi

Biyosensörün cevap süresi, biyosensörün doğrusal tayin aralığı için gerçekleştirilen ölçümlere göre belirlendi. Şekil 4.6. (b)'deki grafik incelendiğinde,

devreden geçen akım sabitlendikten sonra, reaksiyon hücresine gallik asit çözeltisinin eklenmesi ile devreden geçen akımın tekrar sabitlenmesi arasında geçen sürenin yaklaşık 50 ila 100 saniye olduğu görülmektedir.

Eremia vd. (2013), karbon screen-printed elektrodu kullanarak platin nanoparçacık ve indirgenmiş grafen oksit ile lakkazı adsorbe ederek geliştirdikleri amperometrik biyosensörün kafeik asit için cevap süresini 60 saniye; Litescu vd. (2010), screen-printed çalışma elektrodu üzerine lakkazın adsorpsiyonu ile geliştirdikleri lakkaz temelli amperometrik biyosensörün kateşol için cevap süresini 100 saniye olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir. Literatürde, ideal biyosensörlerden beklenen cevap süresi için 5 dk'ya kadar olan değerler kabul edilebilmekte iken 10 dk'lık süre biyosensör ile yapılan ölçümler için uzun bir cevap süresi olarak değerlendirilmektedir (Yarar, 2014).

Bu sonuçlara göre, çalışmamızda elde edilen değer, lakkaz temelli biyosensörün cevap süresi açısından ideal bir biyosensör olduğunu göstermektedir.

4.3.4. Lakkaz Temelli Biyosensör için Tekrarlanabilirlik Çalışması

Biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışması kapsamında, hazırlanan biyosensör ile aynı gün içerisinde, optimum koşullar sağlanarak reaksiyon ortamında 20'şer µM gallik asit olacak şekilde substrat eklenerek 10 farklı ölçüm gerçekleştirildi. Her ölçüm arasında çalışma tamponunda, 15 dk boyunca rejenerasyon işlemi gerçekleştirildi. Gallik asit için çizilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi kullanılarak, 10 ölçüm sonucunda elde edilen akım değerlerine karşılık gelen gallik asit derişimleri belirlendi (Çizelge 4.2). Belirlenen derişim değerleri için, ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (±S.S.) ve varyasyon katsayısı (% V.K.) sırasıyla, 20,83544 ±0,774916 µM ve % 3,7 olarak hesaplandı.

Gamella vd., 2006, Di Fusco vd., 2010 ve Montereali vd., 2010 tarafından geliştirilen biyosensörler ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmalarında sırasıyla 20, 6 ve 12 ölçüm alındığı ve elde edilen % V.K. değerlerinin, % 5,2, % 3-4 ve % 9,8 olarak hesaplandığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlara göre elde edilen veriler kabul edilebilir sınır değerleri içerisindedir.

Çizelge 4.2. Optimum çalışma koşullarında (50 mM fosfat tamponu, pH 6,0; 40°C) gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları

Ölçüm sayısı	Gallik Asit (µM)	Akım Değişimi (nA)	Ölçülen derişim (µM)
1	20	1340	21,78225
2	20	1323	21,4088
3	20	1292	20,7278
4	20	1239	19,5635
5	20	1297	20,83764
6	20	1234	19,45366
7	20	1310	21,12322
8	20	1304	20,99141
9	20	1330	21,56258
10	20	1300	20,90354

*Ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (±S.S.) 20,83544 ±0,774916 µM ve varyasyon katsayısı (% V.K.) 3,7 olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar, Microsoft Office Excel programı ile yapıldı.

4.3.5. Lakkaz Temelli Biyosensör için Girişime Neden Olabilecek Maddelerin Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, hardaliye ve şarap gibi gıda ürünlerinde kullanılan gıda katkı maddelerinin lakkaz temelli biyosensörün cevabına girişim etkilerinin belirlenmesi amacıyla, katkı maddesi olarak koruyucu görevini üstlenen; sodyum benzoat, sodyum bisülfit, benzoik asit; antioksidan ve asidik düzenleyici olarak kullanılan askorbik asit ve tatlandırıcı olarak kullanılan glukoz seçildi.

Hardaliye ve şarapta bulunan ve girişime neden olabilecek maddelerin; 30 mg/L sodyum bisülfit, % 0,2 (w/v) sodyum benzoat, % 0,015 (w/v) benzoik asit, 100 µM glukoz ve 2 mg/L askorbik asit çözeltileri hazırlandı (Coşkun, 2017; Gamella vd., 2006). Biyosensör ile her bir girişime neden olabilecek maddelerin bulunduğu reaksiyon ortamında 25 µM gallik asit için optimum koşullarda ölçümler gerçekleştirildi. Bu çalışmada kullanılan, reaksiyon ortamındaki girişime neden olabilecek maddelerin isimleri, reaksiyon ortamındaki derişimleri, girişime neden olabilecek maddeler

yokluğunda ve varlığında 25 µM gallik asit için elde edilen akım değişimleri (nA) ve maddelerin girişim etkisi bağıl (%) şeklinde Çizelge 4.3'te verilmektedir.

Çizelge 4.3. Girişime neden olabilecek maddelerin biyosensör cevabına etkileri

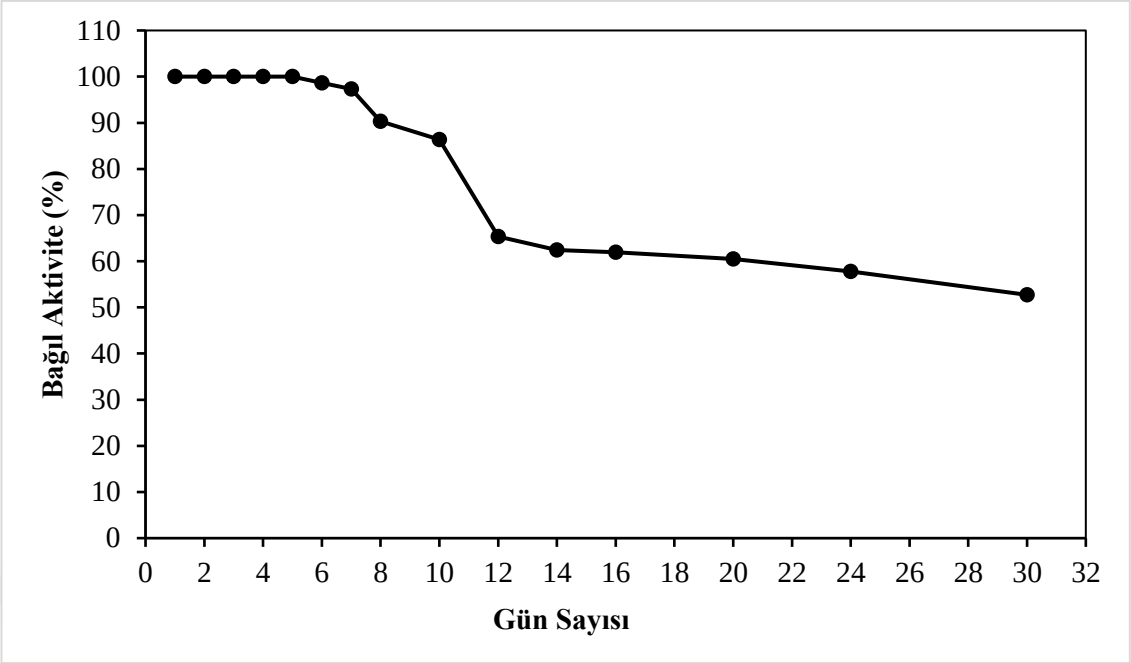
Girişime Neden Olabilecek Madde Türü	Derişim	Girişime Neden Olabilecek Madde Olmaksızın Biyosensör Cevabı (nA)	Girişime Neden Olabilecek Madde Varlığında Biyosensör Cevabı (nA)	Girişime Neden Olabilecek Maddenin Biyosensör Cevabına Etkisi[a] Bağıl (%)
Sodyum benzoat	% 0,20 (w/v)	1137	1247	109,67
Sodyum bisülfit	30 mg/L	1492,5	1323,33	88,67
Askorbik asit	2 mg/L	1336,6	1434,3	107,31
Benzoik asit	% 0,015 (w/v)	1449	1457,5	100,59
Glukoz	100 µM	1545	1598,75	103,48

[a] Girişime neden olabilecek madde varlığında elde edilen akım değişiminin, girişime neden olabilecek madde eklenmeksizin elde edilen akım değişimine oranı

Çizelge 4.3 incelendiğinde, en fazla girişim etkisi olan maddenin sülfit içeren koruyucu madde grubundan sodyum bisülfit olduğu görülmektedir. Sodyum benzoat, ve askorbik asitin girişim etkileri % 10'dan düşük, benzoik asit ve glukozun girişim etkileri ise ihmal edilebilir düzeydedir. Fenolik madde modeli olarak seçilen gallik asit çözeltileri için elde edilen biyosensör cevaplarına göre, geliştirilen biyosensörün gıdalarda gerçekleştirilecek fenolik madde analizlerinde kullanılabileceği söylenebilir.

4.3.6. Lakkaz Temelli Biyosensörün Depo Kararlılığı

Lakkaz temelli biyosensörünün depo kararlılığını belirlemek amacıyla, biyosensör 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) içerisinde, 25°C'de ve karanlıkta depolandı. Depolanma süresince, belirli aralıklarla 10 µM gallik asit için amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Biyosensörden elde edilen en yüksek akım değişimi % 100 kabul edilerek her bir ölçüm için bağıl aktivite değerleri hesaplandı. 30 günlük depolanma süresince elde dilen sonuçlar, Bağıl aktivite (%)-Zaman (gün sayısı) grafiğinde gösterildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Lakkaz temelli biyosensör için depo kararlılığı çalışması: Ölçümler, reaksiyon ortamında 10 µM gallik asit için 50 mM fosfat tamponunda (pH 6,0), 40°C sıcaklıkta, +0,7 V sabit potansiyelde amperometrik olarak gerçekleştirildi.

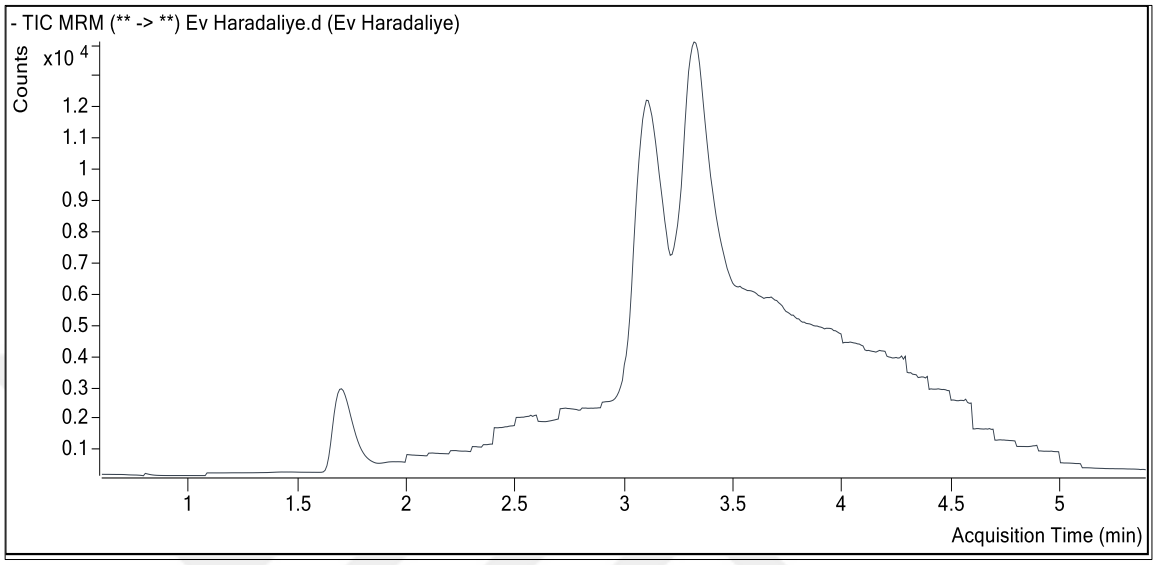
Şekil 4.7 incelendiğinde, oda koşullarında depolanan biyosensörün ilk 7 gün boyunca immobilize enzim aktivitesini yaklaşık % 100; 10 gün boyunca % 86 oranında koruduğu görülmektedir.

Lakkaz, depo kararlılığı oldukça yüksek olan dayanıklı bir enzimdir. İmmobilizasyon yöntemine bağlı olarak depo kararlılığında değişiklikler olabilmektedir. Literatür incelendiğinde, fenolik madde tayini için geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün raf ömrünün analitik çalışmalar için kullanılabilecek düzeyde olduğu görülmektedir (Rodriguez-Delgado vd., 2015).

4.4. Gerçek Örnek Analizi

Geliştirilen lakkaz temelli biyosensör ile ev yapımı hardaliye ve ev yapımı şarap için toplam fenolik madde tayini gerçekleştirilerek biyosensörün uygulanabilirliği incelendi. Ayrıca karşılaştırma için örnekler, likid kromatografi-kütle/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak üçlü kuadrupol performansıyla da analiz edildi. Bu analiz için 32 tane fenolik madde standart olarak kullanılarak tarandı. Elde

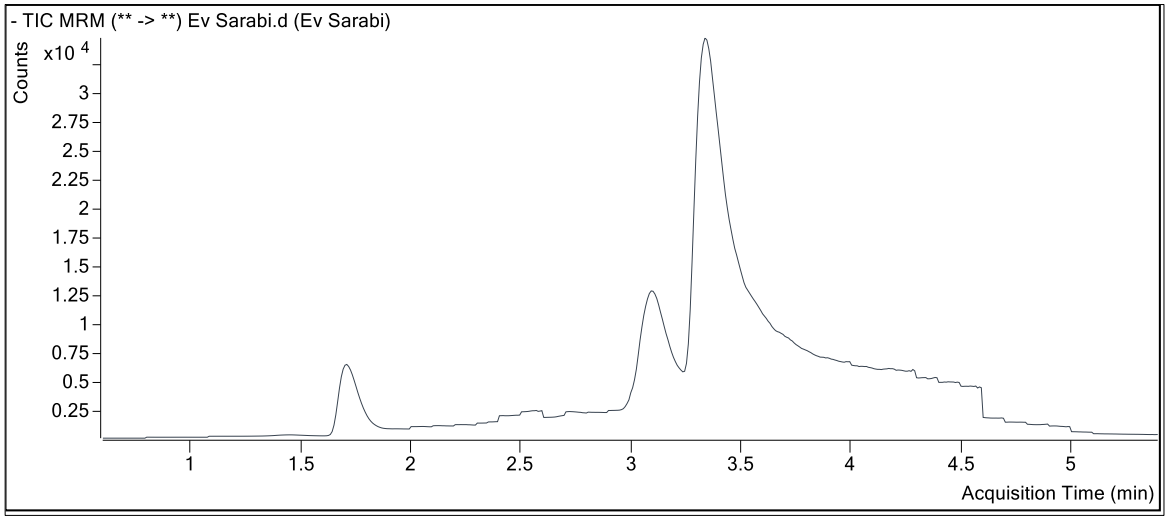
edilen sonuçlar ev yapımı hardaliye ve şarap için ng/mL cinsinden Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te sırasıyla verildi. Biyosensör ile elde edilen sonuçlar, LC-MS/MS yönteminden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Ev yapımı hardaliye için LC-MS/MS kromatogramı

Çizelge 4.4. Ev yapımı hardaliyedeki toplam fenolik bileşik miktarı

Fenolik Bileşik	**Final Derişimi (ng/ml)**
Gallik Asit	1578,9894
Protokateşik Asit	207,6827
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	169,3591
Salisilik Asit	580,3782
Şiringik Asit	512,1782
Kateşin	9263,1043
Kafeik Asit	2315,3912
Tirozol	1198,5066
Florizin	75,1006
p-Kumarik Asit	1619,2402
Absisik Asit	204,8295
Etil Galat	5183,0898
Trans Ferrulik Asit	190,7684
Mirisetin	176,9562
Kuersetin	31759,2429
Resveratrol	1757,9117
Isorhamnetin	5732,3197
Toplam	**62525,0487**



Şekil 4.9. Ev yapımı şarap için LC-MS/MS kromatogramı

Çizelge 4.5. Ev yapımı şaraptaki toplam fenolik bileşik miktarı

Fenolik Bileşik	**Final Deişimi (ng/ml)**
Gallik Asit	4056,0695
Protokateşik Asit	462,1772
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	266,2497
Salisilik Asit	910,0109
Şiringik Asit	976,0796
Kateşin	10829,6402
Kafeik Asit	1565,3803
Tirozol	696,7778
Florizin	85,3551
p-Kumarik Asit	193,4642
Absisik Asit	527,9567
Etil Galat	23621,0387
Trans Ferrulik Asit	197,1850
Mirisetin	57,1957
Propil Galat	10,5415
Kuersetin	23513,8458
Resveratrol	2722,0243
Isorhamnetin	15867,8265
Toplam	**86558,8187**

Geliştirilen biyosensör, ev yapımı hardaliye ve aynı üzümden yapılan ev yapımı kırmızı şarabın toplam fenolik madde içeriğinin elektrokimyasal tahmini için kullanıldı. Gerçek örnek numunelerinin analizi için gallik asit stok çözeltisi ile oluşturulan

kalibrasyon grafiğine karşılık gelen amperometrik sinyallerin interpolasyonu elde edildi. Gerçek örnek analizi başlığı altında açıklanan prosedür, her numune için üç kez tekrarlandı. Güven aralıkları 0,05 anlamlılık düzeyi için hesaplandı ve % V.K. değerleri tüm durumlarda <%3 bulundu. Sonuçlar, Çizelge 4.6'da özetlendi.

Çizelge 4.6. Lakkaz temelli biyosensör kullanılarak elde edilen gallik asitin mililitresinde miligram olarak ifade edilen toplam fenolik madde içeriği ve LC-MS/MS metodu uygulaması ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

Örnek	Biyosensör (mg/mL)	LC-MS/MS yöntem (mg/mL)	Geri kazanım
Hardaliye	0,0628	0,062525	100,44
Kırmızı şarap	0,0841	0,086558	97,2

Biyosensörle yapılan çalışmada, bir örnek analizi için toplam sürenin yaklaşık 200 saniyeden uzun olmadığına dikkat edilmelidir. Biyosensör ile yapılan amperometrik ölçümler incelendiğinde fenolik madde içeriğinin değerleri, kırmızı şarap için hardaliyeden daha yüksektir.

Bu numuneler için gallik asitin mililitresi başına nanogram olarak ifade edilen toplam fenolik madde içeriği, LC-MS/MS yöntemi uygulanarak elde edilen sonuçlarla doğrudan karşılaştırılmıştır. Biyosensör ile elde edilen sonuçlar verilen tüm numuneler için LC-MS/MS yöntemiyle elde edilen sonuçlarla iyi korelasyonlar göstermektedir.

Çizelge 4.7'de toplam fenolik madde tayini için geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün literatürdeki diğer biyosensör sistemleriyle bazı özellikleri kıyaslanmaktadır.

Çizelge 4.7. Toplam fenolik madde tayini için geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün literatürdeki diğer biyosensör sistemleriyle karşılaştırılması

Enzim Kaynağı	Biyoaktif Tabaka İçeriği ve İmmobilizasyon Tekniği	Optimum pH ve Sıcaklık	Substrat	Doğrusal Aralık	LOD	Cevap Süresi	Depo Kararlılığı	Örnek Uygulaması	Referans
T. versicolor 0,83 U/mg	Platin elektrot-polietersülfon membran 0,083 U lakkaz Adsorpsiyon	pH 3,5 0,1 M asetat tamponu	Kateşin Kafeik asit	2,0-14,0x10^{-6} M	1,0x10^{-6} M	-	-	Kırmızı şarap örnekleri	Gomes vd., 2004
T. versicolor 23,7 U/mg	Camsı karbon elektrot Glutaraldehit 1,18 U/µL lakkaz Çapraz bağlama	pH 5,0 0,1 M sitrat tamponu	Gallik asit Kafeik asit	0,003-0,80 mg/L 0,07-10x10^{-2} mg/L	2,6x10^{-3} mg/L 7,2x10^{-4} mg/L	30 s	-	Şarap örnekleri	Gamella vd., 2006
T. versicolor 23,3 U/mg	Camsı karbon elektrot Sonojel-nafyon 23 U lakkaz Tutuklama	pH 5,0 0,05 M asetat tamponu ve 22°C	Kafeik asit Ferulik asit Gallik asit (+)-Kateşin (-)-Epikateşin	0,04-2 µM 0,04-2 µM 0,1-22 µM 0,04-3 µM 0,04-8 µM	0,06 µM 0,16 µM 0,41 µM 0,10 µM 0,16 µM	16 s	3 haftalık sürenin sonunda aktivitesinin % 84,6'sını korumuştur	Bira örnekleri	ElKaoutit vd., 2008
T. versicolor 25 U/mg	Altın/ Kitosan/ MWCNT elektrot sistemi 25 U/mL lakkaz Tutuklama	pH 4,5 McIlvaine tamponu	Kafeik asit Rozmarinik asit Klorojenik asit Gallik asit	0,735-10,5 µM 0,91-12,1 µM 0,793-6,71 µM 0,79-2,1 µM	2,75x10^{-7} M 1,51x10^{-7} M 2,33x10^{-7} M 1,61x10^{-7} M	120 s	-	Nane özleri (*Salvia officinalis* ve *Mentha piperita*)	Diaconu vd., 2010
T. versicolor 30,6 U/mg	Screen-printed elektrot MWCNT Poliaziridin 0,80 U lakkaz Çapraz bağlama	pH 5,0 0,1 M Britton-Robinson tamponu	Gallik asit	0,1-17 µM	0,1 mg/L	-	-	Şarap örnekleri	Di Fusco vd., 2010

Çizelge 4.7. Toplam fenolik madde tayini için geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün literatürdeki diğer biyosensör sistemleriyle karşılaştırılması (devam)

Enzim Kaynağı	Biyoaktif Tabaka İçeriği ve İmmobilizasyon Tekniği	Optimum pH ve Sıcaklık	Substrat	Doğrusal Aralık	LOD	Cevap Süresi	Depo Kararlılığı	Örnek Uygulaması	Referans
T. versicolor 18,000 U/mg	Screen-printed grafit elektrot PVA fotopolimeri 10 mg/mL lakkaz (100 µL) Tutuklama	pH 4,7 0,1 M asetat tamponu ve 30°C	Kateşol Kafeik asit Hidrokinon Rezorsinol	0,5-175 µM 0,5-130 µM 1,1-130 µM 50-250 µM	0,558 µM 0,524 µM 1,071 µM 35,432 µM	-	2 aylık sürenin sonunda aktivitesinin % 90'ını korumuştur	Çay infüzyonları	Ibarra-Escutia vd., 2010
T. versicolor 26 U/mg	Screen-printed elektrot Nafyon 300 mU lakkaz Adsorpsiyon	pH 4,5 0,1 M sitrat tamponu	Kateşol Kafeik asit Klorojenik asit Gallik asit Rozmarinik asit	1,2-10 µM 3-15 µM 3-15 µM 2-7 µM 3-15 µM	$4,3x10^{-7}$ M $2,5x10^{-6}$ M $2,8x10^{-6}$ M $1,55x10^{-6}$ M $2,4x10^{-6}$ M	100 s	98 günlük sürenin sonunda aktivitesinin % 92'sini korumuştur	Bitki özleri (*Salvia officinalis*)	Litescu vd., 2010
T. versicolor 30,6 U/mg	Screen-printed grafit elektrot Ferrosen 30,6 U/10 µL lakkaz Tutuklama	pH 6,0 0,1 M fosfat tamponu	Fenol Gallik asit Kafeik asit Kateşin Kateşol	-	620 µM 380 µM 6,0 µM 20 µM 10 µM	-	-	Şıra ve şarap örnekleri	Montereali vd., 2010
T. versicolor 1000 U/mL	Clarke tipi elektrot Jelatin 400 U/mL lakkaz Tutuklama	pH 4,5 0,1 M sodyum asetat tamponu ve 35°C	Kafeik asit Ferulik asit	0-100 µM 0-100 µM	-	-	-	Meyve suları	Ünal & Kaşıkara-Pazarlıoğlu, 2011

Çizelge 4.7. Toplam fenolik madde tayini için geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün literatürdeki diğer biyosensör sistemleriyle karşılaştırılması (devam)

Enzim Kaynağı	Biyoaktif Tabaka İçeriği ve İmmobilizasyon Tekniği	Optimum pH ve Sıcaklık	Substrat	Doğrusal Aralık	LOD	Cevap Süresi	Depo Kararlılığı	Örnek Uygulaması	Referans
T. versicolor 21,8 U/mg	Camsı karbon elektrot CNT-NH_2/altın nanoparçacıklar bovine serum albümin 4,5 mg/mL lakkaz Kovalent bağlama	pH 5,0 0,1 M sitrat tamponu	Kafeik asit Kateşin Gallik asit Klorojenik asit Troloks	0,3-45 µM 1,7-30 µM 3-60 µM 1,5-30 µM 2-35 µM	0,49 µM 0,20 µM 0,71 µM 0,10 µM 0,10 µM	-	-	Çay örnekleri	Amatatongchai vd., 2013
T. versicolor 1,34 U/mg	Screen-printed karbon-platin nanoparçacıklar-indirgenmiş grafen oksit-nafyon 300 mU/5,0 µL lakkaz Adsorpsiyon	pH 5,0 0,1 M asetat tamponu ve 24°C	Kafeik asit Rozmarinik asit Gallik asit Luteolin	0,2-2,5 µM 0,45-2,5 µM 0,25-2,5 µM 0,25-3,0 µM	0,09 µM 0,15 µM 0,15 µM 0,12 µM	60 s	6 haftalık sürenin sonunda aktivitesinin % 87,4'ünü korumuştur	Çay infüzyonları	Eremia vd., 2013
T. versicolor 30,6 U/mg	Altın elektrot/Altın nanoparçacıklar/ fulleren 0,076 U/µL lakkaz Kovalent bağlama	pH 4,5 0,1 M asetat tamponu ve 25°C	Gallik asit	30-300 µM	1,1 mg/L	-	120 günlük sürenin sonunda aktivitesinin % 87'sini korumuştur	Şarap örnekleri	Lanzellotto vd., 2014

Çizelge 4.7. Toplam fenolik madde tayini için geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün literatürdeki diğer biyosensör sistemleriyle karşılaştırılması (devam)

Enzim Kaynağı	Biyoaktif Tabaka İçeriği ve İmmobilizasyon Tekniği	Optimum pH ve Sıcaklık	Substrat	Doğrusal Aralık	LOD	Cevap Süresi	Depo Kararlılığı	Örnek Uygulaması	Referans
T. versicolor 10 U/mg	Camsı karbon elektrot Glikol-kitosan 2 U/20 µL lakkaz Çapraz bağlama	pH 5,5 0,1 M sodyum fosfat tamponu ve 25°C	Kateşol 3,4-Ksilenol Fenol Hidrokinon 4-Kloro-1-Naftol	0,2-15 µM 9,9-30 µM 5-30 µM 5-30 µM 5-19 µM	76,00 nM 5000 nM 4900 nM 2500 nM 4300 nM	7 s	2 haftalık sürenin sonunda aktivitesinin % 100'ünü korumuştur	Bitki çayları	Boujakhrout vd., 2016
T. versicolor ≥ 10 U/mg	Screen-printed karbon elektrot, MoS_2-GQDs 0,129 U/5,0 µL lakkaz Adsorpsiyon	pH 5,0 0,1 M asetat tamponu ve 24°C	Kafeik asit Klorojenik asit (-)-Epikateşin	0,38-100 µM 0,38-100 µM 2,86-100 µM	0,32 µM 0,19 µM 2,04 µM	-	4 haftalık sürenin sonunda aktivitesinin % 85'ini korumuştur	Kırmızı şarap örnekleri	Vasilescu vd., 2016
T. versicolor ≥ 0,5U/mg	Camsı karbon elektrot İndirgenmiş grafen oksit-MWCNT 0,02 U/10 µL lakkaz Çapraz bağlama	pH 4,5 0,1 M asetat tamponu	Kateşol	1-300 µM	0,3 µM	30 s	4 haftalık sürenin sonunda aktivitesinin % 93,3'ünü korumuştur	Meyve suları	Vlamidis vd., 2017
T. versicolor 13,6 U/mg	Karbon pasta elektrot 1,25 U/5,0 µL lakkaz Jelatinde tutuklama	pH 6,0 50 mM fosfat tamponu ve 40°C	Gallik asit	0,5-100 µM	0,1323 µM	50-100 s	10 günlük sürenin sonunda aktivitesinin % 86'sını korumuştur	Hardaliye ve şarap örnekleri	Bu çalışma

Çizelge 4.7, literatürde platin, altın, camsı karbon, screen-printed ve Clark tipi elektrotlar kullanılarak toplam fenolik madde tayini için geliştirilen lakkaz temelli biyosensörler ile bu çalışmada karbon pasta elektrot kullanılarak hazırlanan lakkaz temelli biyosensörün immobilizasyon koşulları, çalışma koşulları ve bazı performans özelliklerini karşılaştırmaktadır. Diaconu vd., 2010, Amatatongchai vd., 2013, Eremia vd., 2013, Lanzellotto vd., 2014 tarafından geliştirilen biyosensörlerin hazırlanma süreçlerinde kullanılan materyaller ve işlem adımları bu çalışma ile kıyaslandığında, karbon pasta elektrodun hazırlanmasının daha basit adımlara ihtiyaç duyduğu ve buna bağlı olarak hazırlama metodunun daha düşük maliyetli olduğu söylenebilir. Gallik asit için geliştirdiğimiz biyosensör ile elde edilen doğrusal tayin aralığı (0,5-100 µM), ElKaoutit vd., 2008, Di Fusco vd., 2010, Diaconu vd., 2010, Litescu vd., 2010, Amatatongchai vd., 2013 ve Eremia vd., 2013'nin çalışmalarındaki sonuçlara göre daha geniş bir ölçüm aralığında olup fenolik madde analizlerinde önemli bir avantaj sunmaktadır. Ayrıca hesaplanan LOD değerine göre geliştirilen lakkaz temelli biyosensörün tayin sınırının (0,1323 µM), Diaconu vd., 2010 ve Eremia vd., 2013 tarafından rapor edilen biyosensörlerin tayin sınırı değerlerine yakın olduğu, ElKaoutit vd., 2008, Litescu vd., 2010, Montereali vd., 2010 ve Amatatongchai vd., 2013 tarafından hesaplanan değerlere göre ise daha düşük olduğu görülmektedir. Literatür incelendiğinde, biyosensörün cevap süresinin (50-100 saniye arasında değişen) analizler için uygun olduğu belirlenmiştir. Lakkazın tutuklama yöntemi ile immobilizasyonuna dayanarak ElKaoutit vd., 2008, Ibarra-Escutia vd., 2010, Montereali vd., 2010 ve Ünal & Kaşıkara-Pazarlıoğlu, 2011 tarafından geliştirilen biyosensörler ile optimum çalışma koşulları karşılaştırıldığında, çalışmamızda nötr pH değerine daha yakın (50 mM fosfat tamponu, pH 6,0) ve daha yüksek sıcaklıkta (40°C) en iyi cevapların elde edildiği görülmektedir. Yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarına göre de lakkazın immobilize edildiği jelatin matriks yapısının 40°C'de kararlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, biyosensörün oda koşullarında depolanma süresi literatüre uygundur.

Bu çalışma ile ilk kez hardaliyenin toplam fenolik madde tayininin analizi için lakkaz temelli amperometrik bir biyosensör geliştirildi. Biyosensörün hazırlanması oldukça kısa sürede, basit işlem adımları kullanılarak gerçekleştirildi. Örnek analizleri için herhangi bir ön işlem uygulanmadan biyosensör ölçümleri yapıldı. Ev yapımı hardaliye ve ev yapımı şarap için biyosensör ile elde edilen sonuçların, LC-MS/MS ile

elde edilen sonuçlarla iyi korelasyon gösterdiği belirlendi. Bu sonuçlara göre, geliştirdiğimiz biyosensörün toplam fenolik tayini için güvenilir olduğu belirtilebilir.

İleriki çalışmalarda, lakkazın aktifleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüplere immobilizasyonu temelli bir biyosensör geliştirilmesi ve farklı gıda örneklerinin analizlerinde toplam fenolik madde tayini için kullanılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

Abhijith, K. S., Kumar, P. V., Kumar, M. A. & Thakur, M. S. (2007). Immobilised tyrosinase based biosensor for the detection of tea polyphenols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *389*, 2227-2234. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1604-5

Akkan, A. C. (2008). *Bazı Fenolik Asit Bileşiklerinin Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tayini*. (Yüksek Lisans Tezi). Anadolu Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Aktaç, Ş., Hasköylü, A. & Güneş, F. E. (2015). *Nutritional Properties of Hardaliye*. The 3rd International Symposium on 'Traditional Foods from Adriatic to Caucasus', Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

Aktan, N. & Kalkan, H. (2000). *Şarap Teknolojisi*. Ankara: Kavaklıdere Eğitim Yayınları.

Almansa, E., Kandelbauer, A., Pereira, L., Cavaco-Paulo, A. & Guebitz, G. M. (2004). Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems. *Biocatalysis and Biotransformation*, *22*, 315-324. https://doi.org/10.1080/10242420400024508

Amatatongchai, M., Sroysee, W., Laosing, S. & Chairam, S. (2013). Rapid screening method for assessing total phenolic content using simple flow ınjection system with laccase based biosensor. *International Journal of Electrochemical Science*, *8*, 10526-10539.

Annachhatre, A. P. & Gheewala, S. H. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnology Advances*, *14*, 35-56. https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00002-X

Arıcı, M. & Coşkun, F. (2001). Hardaliye: Fermented grape juice as a traditional Turkish beverage. *Food Microbiology*, *18*, 417-421. https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0413

Aron, P. M. & Kennedy, J. A. (2007). Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir during fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 5670-5680. https://doi.org/10.1021/jf0704817

Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N. & Chaudhury, A. (2011). Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, *28*, 1-12. https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.06.002

Aydın, G. (2021). *Lupinus Angustifolius L. Subsp. Angustifolius (Fabaceae) Taksonunun Antioksidan, Anti-Tüberküloz Ve Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Balıkesir Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Aydındoğan, E., Balaban, S., Evran, S., Coşkunol, H. & Timur, S. (2019). A bottom-up approach for developing aptasensors for abused drugs: Biosensors in forensics. *Biosensors, 9*(4), 118. https://doi.org/10.3390/bios9040118

Aydındoğan, E., Güler-Çelik, E. & Timur, S. (2018). Paper-based analytical methods for smartphone sensing with functional nanoparticles: Bridges from smart surfaces to global health. *Analytical Chemistry, 90*(21), 12325-12333. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03120

Aydınlık, Z. (2012). *Niğde İlinde Üretilen Üzüm Pekmezi Örneklerinin Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Niğde Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde.

Aydoğdu, H., Yıldırım, S., Halkman, A. K. & Durgun, T. (2014). A study on production and quality criteria of hardaliye; A traditional drink from Thrace region of Turkey. *Gıda*, *39*(3), 139-145.

Balaban, S., Man, E., Durmuş, C., Bor, G., Ceylan, A. E., Pınar-Gümüş, Z., Evran, S., Coşkunol, H. & Timur, S. (2020). Sensor platform with a custom-tailored aptamer for diagnosis of synthetic cannabinoids. *Electroanalysis*, *32*(3), 656-665. https://doi.org/10.1002/elan.201900670

Boujakhrout, A., Jimenez-Falcao, S., Martinez-Ruiz, P., Sanchez, A., Diez, P., Pingarron, J. M. & Villalonga, R. (2016). Novel reduced graphene oxide-glycol chitosan nanohybrid for the assembly of an amperometric enzyme biosensor for phenols. *Analyst, 141*(13), 1-9.

Bozan, B., Koşar, M., Tunalier, Z., Öztürk, N. & Başer, K. H. C. (2003). Antioxidant and free radical scavenging activities of *Rhus coriaria* and *Cinnamomum cassia* extracts. *Acta Alimentaria, 32*(1), 53-61. https://doi.org/10.1556/aalim.32.2003.1.7

Bozan, B., Öztürk, N., Tunalier, Z., Koşar, M. & Başer, K. H. C. (2002). Antioxidant and free radical scavenging activities of eight *Salvia* species. *Chemistry of Natural Compounds, 38*, 198-200. https://doi.org/10.1023/A:1019664720443

Brady, D. & Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters, 31*, 1639-1650. https://doi.org/10.1007/s10529-009-0076-4

Cadenas, E. & Packer, L. (2002). *Handbook of Antioxidants* (2nd Edition). New York: CRC Press.

Call, H. P. & Mucke, I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology, 53*, 163-202. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01683-0

Campana, A. L., Florez, S. L., Noguera, M. J., Fuentes, O. P., Puentes, P. R., Cruz, J. C. & Osma, J. F. (2019). Enzyme-based electrochemical biosensors for microfluidic platforms to detect pharmaceutical residues in wastewater. *Biosensors*, *9*(1), 41. https://doi.org/10.3390/bios9010041

Campanella, L., Bonanni, A., Finotti, E. & Tomasetti, M. (2004). Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacitiy of red and White wines: comparison with other spectrophotometric and flourimetric methods. *Biosensors and Bioelectronics*, *19*, 641-651. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00276-8

Carralero-Sanz, V., Luz-Mena, M., Gonzalez-Cortes, A., Yanez-Sedeno, P. & Pingarron, J. M. (2005). Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines. *Analytica Chimica Acta*, *528*, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.007

Chawla, S., Rawal, R., Sharma, S. & Pundir, C. S. (2012). An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto nickel nanoparticles/carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline modified gold electrode for determination of phenolic content in fruit juices. *Biochemical Engineering Journal*, *68*, 76-84. https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.07.008

Chefetz, B., Chen, Y. & Hadar, Y. (1998). Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 3175-3179. https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3175-3179.1998

Cho, N., Cho, H., Shin, S., Choi, Y., Leonowicz, A. & Ohga, S. (2008). Production of fungal laccase and its immobilization and stability. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, *53*(1), 13-18. https://doi.org/10.5109/10063

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

Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*, 362-372. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<362::AID-JSFA256>3.0.CO;2-D

Cortina-Puig, M., Munoz-Berbel, X., Calas-Blanchard, C. & Marty, J.-L. (2010). Diazonium-functionalized tyrosinase-based biosensor for the detection of tea polyphenols. *Microchimica Acta*, *171*, 187-193. https://doi.org/10.1007/s00604-010-0425-y

Coşkun, F. (2017). A traditional turkish fermented non-alcoholic grape-based beverage, 'Hardaliye'. *ResearchGate*, *3*, 1-11. https://doi.org/10.3390/beverages3010002

Coşkun, F. & Arıcı, M. (2006). The effects of using different mustard seeds and starter cultures on some properties of hardaliye. *Annals of Microbiology*, *56*(4), 335-337. https://doi.org/10.1007/BF03175027

Coşkun, F., Arıcı, M., Çelikyurt, G. & Gülcü, M. (2012). Changes occuring at the end of storage in some properties of hardaliye produced by using different methods. *Journal of Tekirdağ Agricultural Faculty*, *9*(3), 62-67.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews, 12*, 564-582. https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564

Crozier, A., Ashihara, H. & Clifford, M. N. (2006a). *Plant Secondary Metabolites: Occurence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford: Blackwell.

Crozier, A., Jaganath, I. B. & Clifford, M. N. (2006b). Phenols, polyphenols and tannins: An overview. *Wiley Online Library*, 1-31. https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch1

Crozier, A., Yokota, T., Jaganath, I. B., Marks, S. C., Saltmarsh, M. & Clifford, M. N. (2006c). Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant-based dietary components. *Wiley Online Library*, 208-302. https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch7

Çoban, S. (2008). *Development of Biosensors for Determination of the Total Antioxidant Capacity*. (Master of Science). İzmir Institute of Technology/Institue of Engineering and Science, İzmir.

Decker, H., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, E. & Tuczek, F. (2007). Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene*, *398*, 183-191. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.02.051

Decker, H. & Terwilliger, N. (2000). Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*, *203*, 1777-1782. https://doi.org/10.1242/jeb.203.12.1777

De Wael, K., Bashir, Q., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Heering, H. A. ve Adriaens, A. (2012). Electrochemical determination of hydrogen peroxide with cytochrome c peroxidase and horse heart cytochrome c entrapped in a gelatin hydrogel. *Bioelectrochemistry*, *83*, 15-18. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.07.001

De Wael, K., De Belder, S., Van Vlierberghe, S., Van Steenberge, G., Dubruel, P. ve Adriaens, A. (2010). Electrochemical study of gelatin as a matrix for the immobilization of horse heart cytochrome c. *Talanta*, *82*(5), 1980-1985. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.08.019

Diaconu, M., Litescu, S. C. & Radu, G. L. (2010). Laccase-MWCNT-chitosan biosensor a new tool for total polyphenolic content evaluation from in vitro cultivated plants. *Sensors and Actuators B, 145*, 800-806. https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.01.064

Di Fusco, M., Tortolini, C., Deriu, D. & Mazzei, F. (2010). Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta, 81*, 235-240. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.063

Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. & Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. *Food Chemistry, 83*, 255-262. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00088-8

D'Souza, S. F. (2001). Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics, 16*, 337-353.

Duran, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A. & Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. *Enzyme and Microbial Technology, 31*, 907-931. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00214-4

Dutta, S. & Halder, S. (2021). A colourful food palette: Health benefits and beyond. *International Journal of Current Research, 13*(3), 16596-16600. https://doi.org/10.24941/ijcr.40973.03.2021

ElKaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., Temsamani, K. R., Hernandez-Artiga, M. P., Bellido-Milla, D. & De Cisneros, J. L. H.-H. (2008). A comparison of three amperometric phenoloxidase-Sonogel-Carbon based biosensors for determination of polyphenols in beers. *Food Chemistry, 110*, 1019-1024. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.006

Emregül, E., Kocabay, O., Derkus, B., Yumak, T., Emregül, K. C., Sınag, A. & Polat, K. (2013). A novel carboxymethylcellulose-gelatin-titanium dioxide-superoxide dismutase biosensor; electrochemical properties of carboxymethylcellulose-gelatin-titanium dioxide-superoxide dismutase. *Bioelectrochemistry, 90*, 8-17. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.09.002

Eremia, S. A. V., Vasilescu, I., Radoi, A., Litescu, S.-C. & Radu, G.-L. (2013). Disposable biosensor based on platinum nanoparticles-reduced graphene oxide-laccase biocomposite for the determination of total polyphenolic content. *Talanta, 110*, 164-170. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.029

Esposito, E., Cortesi, R. & Nastrazzi, C. (1996). Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. *Biomaterials, 20*, 2009-2020. https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)00325-8

Ferguson, L. R. & Harris, P. J. A. (1999). Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *European Journal of Cancer Prevention, 8*(1), 17-25.

Fernandez-Fernandez, M., Sanroman, M. A. & Moldes, D. (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances, 31*, 1808-1825. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.013

Ferreira, F. D. P., Silva, L. I. B., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A. P. & Duarte, A. C. (2009). High performance liquid chromatography coupled to an optical fiber detector coated with laccase for screening catecholamines in plasma and urine. *Journal of Chromatograph A, 1216*(42), 7049-7054. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.067

Fraga, C. G. (Ed.) (2010). *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. New Jersey: Wiley.

Freire, R. S., Duran, N. & Kubota, L. T. (2001). Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta, 54*, 681-686. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00318-6

Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J. & Haltrich, D. (2002). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology, 148*, 2159-2169. https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2159

Gamella, M., Campuzano, S., Reviejo, J. M. & Pingarron, A. J. (2006). Electrochemical estimation of the polyphenol index in wines using a laccase biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*, 7960-7967. https://doi.org/10.1021/jf061451r

Garcia, L. F., Benjamin, S. R., Marreto, R. N., Lopes, F. M., Golveia, J. C. S., Fernandes, N. C., Santiago, M. F. & Gil, E. S. (2015). Laccase carbon paste based biosensors for antioxidant capacity. The effect of different modifiers. *International Journal of Electrochemical Science, 10*, 5650-5660.

Ge, L., Li, S. P. & Lisak, G. (2020). Advanced sensing technologies of phenolic compounds for pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 179*, 112913. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112913

Ghindilis, A .L., Gavrilova, V. P. & Yaropolov, A. I. (1992). Laccase-based biosensor for determination of polyphenols: determination of catechols in tea. *Biosensors and Bioelectronics, 7*, 127-131. https://doi.org/10.1016/0956-5663(92)90017-H

Gianfreda, L., Xu, F. & Bollag, J.-M. (1999). Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, *3*(1), 1-26. https://doi.org/10.1080/10889869991219163

Gomes, S. A. S. S., Nogueiraa, J. M. F. & Rebelo, M. J. F. (2004). An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics*, *20*, 1211-1216. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.05.013

Goode, J. A., Rushworth, J. V. H. & Millner, P. A. (2015). Biosensor regeneration: a review of common techniques and outcomes. *Langmuir*, *31*, 6267-6276. https://doi.org/10.1021/la503533g

Gorinstein, S., Cvikrov, A. M., Machackov, A. I., Haruenkit, R., Park, Y., Jung, S., Yamamoto, K., Ayala, A., Katrich, E. & Trakhtenberg, S. (2004a). Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits. *Food Chemistry, 84*, 503-510. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00127-4

Gorinstein, S., Zachwieja, Z., Katrich, E., Pawelzik, E., Haruenkit, R., Trakhtenberg, S. & Martin-Belloso, O. (2004b). Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid. *LWT-Food Science and Technology*, *37*, 337-343. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.10.005

Gökdoğan, O. (2011). *Lizin Tayini için Yeni Amperometrik Biyosensörlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu*. (Doktora Tezi). Selçuk Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Granero, A. M., Fernandez, H., Agostini, E. & Zon, M. A. (2010). An amperometric biosensor based on peroxidases from *Brassica napus* for the determination of the total polyphenolic content in wine and tea samples. *Talanta*, *83*(1), 249-255. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.016

Güçer, Y., Poyrazoğlu, E. S. & Artık, N. (2021). GC/MS determination of volatile aromatic compounds of Kalecik Karasi must produced by cold maceration. *Journal of The Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, *36*(3), 1531-1538.

Gül, I., Ahmad, M. S., Naqvi, S. M. S., Hussain, A., Wali, R., Farooqi, A. A. & Ahmed, I. (2017). Polyphenol oxidase (PPO) based biosensors for detection of phenolic compounds: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, *5*(3), 72-85.

Güven, S. & Aksoy, M. (2009). *Some Modifications in Mustard Production*. In Proceedings of the 2nd Traditional Foods Symposium, Van, Turkey.

Han, R., Cui, L., Ai, S., Yin, H., Liu, X. & Oiu, Y. (2012). Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in hydrotalcite-like compounds film for the determination of polyphenols. *Journal of Solid State Electrochemistry*, *16*, 449-456. https://doi.org/10.1007/s10008-011-1352-5

Hernandez-Vargas, G., Sosa-Hernandez, J. E., Saldarriaga-Hernandez, S., Villalba-Rodriguez, A. M., Parra-Saldivar, R. & Iqbal, H. M. N. (2018). Electrochemical biosensors: A solution to pollution detection with reference to environmental contaminants. *Biosensors*, *8*(2), 29. https://doi.org/10.3390/bios8020029

Ho, C. (1991). *Phenolic Compounds in Food* (Cilt 506). American Chemical Society Symposium Series.

Huet, A.-C., Delahaut, P., Fodey, T., Haughey, S. A., Elliott, C. & Weigel, S. (2010). Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *29*(11), 1281-1294. https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.017

Ibarra-Escutia, P., Gomez, J. J., Calas-Blanchard, C., Marty, J. L. & Ramirez-Silva, M. T. (2010). Amperometric biosensor based on a high resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions. *Talanta*, *81*, 1636-1642. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.03.017

Ivnitski, D. & Atanassov, P. (2007). Electrochemical studies of intramolecular electron transfer in laccase from *Trametes versicolor*. *Electroanalysis*, *19*, 2307-2313. https://doi.org/10.1002/elan.200703983

Jackson, R. S. (2000). *Wine Science* (2nd Edition). Academic Press.

Jensen, U. B., Lorcher, S., Vagin, M., Chevallier, J., Shipovskov, S., Koroleva, O., Besenbacher, F. & Ferapontova, E. E. (2012). A 1.76V hybrid Zn-O_2 biofuel cell with a fungal laccase-carbon cloth biocathode. *Electrochimica Acta*, *62*, 218‑226. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.12.026

Jing, T., Xia, H., Niu, J., Zhou, Y., Dai, Q., Hao, Q., Zhou, Y. & Mei, S. (2011). Determination of trace 2,4-dinitrophenol in surface water samples based on hydrophilic molecularly imprinted polymers/nickel fiber electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(11), 4450-4456. https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.05.001

Jung, H., Xu, F. & Li, K. (2002). Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme and Microbial Technology*, *30*(2), 161-168. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00485-9

Junghanns, C., Moeder, M., Krauss, G., Martin, C. & Schlosser, D. (2005). Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology*, *151*, 45-57. https://doi.org/10.1099/mic.0.27431-0

Kahkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 3954-3962. https://doi.org/10.1021/jf990146l

Karim, F. & Fakhruddin, A. N. M. (2012). Recent advances in the development of biosensor for phenol: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *11*, 261-274. https://doi.org/10.1007/s11157-012-9268-9

Kelebek, H., Dıblan, S., Kadiroğlu, P., Kola, O. & Selli, S. (2018). Kurutma işlemlerinin incirlerin (*Ficus Carica* L.) fenolik bileşikler, antioksidan kapasite ve diğer önemli bazı kalite kriterleri üzerine etkileri. *Çukurova Journal of Agricultural and Food Science, 33*(2), 127-136.

Kennedy, J. (2007). The science of red wine. *The New York Academy of Sciences Magazine*, 10-13.

Kıralp A. S., Toppare, A. L. & Yağcı, B. Y. (2003). Immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes. *International Journal of Biological Macromolecules, 33*, 37-41. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(03)00062-X

King, A. & Young, G. (1999). Characteristics and occurance of phenolic phytochemicals. *Journal of American Dieteteic Association, 99*, 213-218. https://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00051-6

Kissinger, P. T. (2005). Biosensors-a perspective. *Biosensors and Bioelectronics, 20*(12), 2512-2516. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.004

Klepacka, J. & Forna, L. (2006). Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46*, 639-647. https://doi.org/10.1080/10408390500511821

Korkutal, I., Bahar, E. & Güvemli-Dündar, D. (2019). Edirne ili Uzunköprü ilçesi bağcılık yapısının incelenmesi. *COMU Journal of Agriculture Faculty, 7*(1), 127-136.

Koyun, A., Ahlatçıoğlu, E. & Koca-İpek, Y. (2012). Biosensors and their principles. *ResearchGate*, 115-142.

Kulys, J. & Bratkovskaja, I. (2007). Antioxidants determination with laccase. *Talanta, 72*, 526-531. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.11.011

Lanzellotto, C., Favero, G., Antonelli, M. L., Tortolini, C., Cannistraro, S., Coppari, E. & Mazzei, F. (2014). Nanostructured enzymatic biosensor based on fullerene and gold nanoparticles: Preparation, characterization and analytical application. *Biosensors and Bioelectronics, 55*, 430-437. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.028

Lazcka, O., Del Campo, F. J. & Munoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics, 22*, 1205-1217. https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036

Leite, O. D., Fatibello-Filho, O. & Barbosa, A. M. (2003a). Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of the Brazilian Chemical Society, 14*, 297-303. https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200018

Leite, O. D., Lupetti, K. O., Fatibello-Filho, O., Vieira, I. C. & Barbosa, A. M. (2003b). Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta*, *59*, 889-896. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00650-1

Liao, X. P., Lu, Z. B. & Shi, B. (2003). Selective adsorption of vegetable tannins onto collagen fibers. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *42*, 3397-3402. https://doi.org/10.1021/ie0209475

Litescu, S. C., Eremia, S. A. V., Bertoli, A., Pistelli, L. & Radu, G.-L. (2010). Laccase-Nafion based biosensor for the determination of polyphenolic secondary metabolites. *Analytical Letters*, *43*, 1089-1099. https://doi.org/10.1080/00032710903518518

Liu, Y., Geever, L. M., Kennedy, J. E., Higginbotham, C. L., Cahill, P. A. & McGuinness, G. B. (2010). Thermal behavior and mechanical properties of physically crosslinked PVA/Gelatin hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *3*, 203-209. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2009.07.001

Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. & Dolara, P. (2001). Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, *39*, 1205-1210. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00067-9

Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K. P., Dexter, D. T. & Aruoma, O. I. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International*, *38*, 357-367. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.005

Macheix, J. J., Fleuriet, A. & Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics* (1st Edition). Boca Raton: CRC Press.

Madhavi, V. & Lele, S. S. (2009). Laccase: Properties and applications. *BioResources*, *4*(4), 1694-1717.

Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. F. C. & Rangel, A. O. S. S. (2006). Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(15), 5241-5246. https://doi.org/10.1021/jf060324s

Mailley, P., Cummings, E. A., Mailley, S., Cosnier, S., Eggins, B. R. & McAdams, E. (2004). Amperometric detection of phenolic compounds by polypyrrole-based composite carbon paste electrodes. *Bioelectrochemistry*, *63*, 291-296. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2003.11.008

Malinowski, S., Herbert, P. A. F., Rogalski, J. & Jaroszyńska-Wolinska, J. (2018). Laccase enzyme polymerization by soft plasma jet for durable bioactive coatings. *Polymers*, *10*(5), 532. https://doi.org/10.3390/polym10050532

Marinova, E. M. & Yanishlieva, N. V. (2003). Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry, 81*, 189-197. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00411-9

Mayer, A. M. & Staples, R. (2002). Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, *60*(6), 551-565. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00171-1

McNaught, A. D. & Wilkinson, A. (1997). *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (2nd Edition). Oxford: Blackwell Scientific.

Mello, L. D. & Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, *77*, 237-256. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00104-8

Minussi, R. C., Pastore, G. M. & Duran, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, *13*, 205-216. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00155-3

Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M. & Duran, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, *82*, 409-416. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00590-3

Mittal, S., Kaur, H., Gautam, N. & Mantha, A. K. (2017). Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosensors and Bioelectronics*, *88*, 217-231. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.028

Montereali, M. R., Della Seta, L., Vastarella, W. & Pilloton, R. (2010). A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *64*, 189-194. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.07.014

Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V. & Yaropolov, Y. I. (2007). Laccase-Mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *43*, 523-535. https://doi.org/10.1134/S0003683807050055

Morozzi, G., Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S. & Taticchi, A. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A, 1054*, 113-127. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.070

Mousty, C., Vieille, L. & Cosnier, S. (2007). Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagentless amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, *22*(8), 1733-1738. https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.020

Nadifiyine, S., Haddam, M., Mandli, J., Chadel, S., Blanchard, C. C., Marty, L. L. & Amine, A. (2013). Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on to a carbon black paste electrode for phenol determination in olive oil. *Analytical Letters*, *46*(17), 2705-2726. https://doi.org/10.1080/00032719.2013.811679

Ncanana, S., Baratto, L., Roncaglia, L., Riva, S., & Burton, S. G. (2007). Laccase-Mediated oxidation of totarol. *Advanced Synthesis and Catalysis, 349,* 1507-1513. https://doi.org/10.1002/adsc.200700005

Nejem, R. M. (2004). *Enantioselective Sensors and Biosensors for Clinical Analysis*. (Master of Science). University of Pretoria/The Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Pretoria.

Odacı, D., Timur, S. & Telefoncu, A. (2004). Immobilized jarusalem artichoke (*Helianyus tuberosus*) tissue electrode for phenol detection. *Artifical Cells, Blodd Substitutes, and Biotechnology*, *32*(2), 315-323. https://doi.org/10.1081/bio-120037836

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Wurtele, G. & Spiegelhalder, B. (2000). Olive-oil consumption and health: The possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology, 1*, 107-112. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00015-2

Özcan, H. M. (2010). *Fenolik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Amperometrik Esaslı Biyosensör Hazırlanması*. (Doktora Tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Padilla-Sanchez, J. A., Plaza-Bolanos, P., Romero-Gonzalez, R., Barco-Bonilla, N., Martinez-Vidal, J. L. & Garrido-Frenich, A. (2011). Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, *85*(5), 2397-2404. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.081

Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L. & Kruus, K. (2003). Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, *33*(6), 854-862. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00247-3

Pedano, M. L. & Rivas, G. A. (2000). Amperometric biosensor for the quantification of gentisic acid using polyphenol oxidase modified carbon paste electrode. *Talanta, 53*(3), 489-495. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00515-4

Pejcic, B. & Marco, R. (2006). Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochimica Acta, 51*, 6217-6229. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.04.025

Periasamy, A. P., Chang, Y. J. & Chen, S. M. (2011). Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry, 80*, 114-120. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.06.009

Portaccio, M., Di Martino, S., Maiuri, P., Durante, D., De Luca, P., Lepore, M., Bencivenga, U., Rossi, S., De Maio, A. & Mita, D. G. (2006). Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 41*, 97-102. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.05.002

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 withthionine-carbon black nanocomposite, for Bisphenol A detection. *Electrochimica Acta*, *109*, 340-347. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.07.129

Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A. & Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, *41*, 111-123. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010

Prior, R. L. & Wu, X. (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, *40*, 1014-1028. https://doi.org/10.1080/10715760600758522

Pundir, C. S., Rawal, R., Chawla, S., Renuka & Kuhad, R. C. (2012). Development of an amperometric polyphenol biosensor based on fungal laccase immobilized on nitrocellulose membrane. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, *40*, 163-170. https://doi.org/10.3109/10731199.2011.637926

Quan, D. & Shin, W. (2004). Amperometric detection of catechol and catecholamines by immobilized laccase from DeniLite. *Electroanalysis*, *16*, 1576-1582. https://doi.org/10.1002/elan.200302988

Rawal, R., Chawla, S., Devender & Pundir, C. S. (2012). An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto Fe_3O_4NPs/cMWCNT/PANI/Au electrode for determination of phenolic content in tea leaves extract. *Enzyme and Microbial Technology*, *51*, 179-185. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.06.001

Revilla, E., Garcia-Beneytez, E., Cabello, F., Martin-Ortega, G. ve Ryan, J.-M. (2001). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, *915*, 53-60. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00635-5

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 2866-2887. https://doi.org/10.1021/jf026182t

Rodriguez-Delgado, M. A., Malovana, S., Perez, J. P., Borges, T. ve Garcia-Montelongo, F. J. (2001). Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, *912*(2), 249-257. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00598-2

Rodriguez-Delgado, M. M., Aleman-Nava, G. S., Rodriguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martinez-Chapa, S. O., Barcelo, D. & Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, *74*, 21-45. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008

Rosatto, S. S., Freire, R. S., Duran, N. & Kubota, L. (2001). Amperometric biosensors for phenolic compounds determination in the environmental interess samples. *Quimica Nova*, *24*, 77-86. https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100014

Roushani, M., Valipour, A. & Valipour, M. (2016). Layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and cysteamine on gold electrode for immunosensing of human chorionic gonadotropin at picogram levels. *Materials Science and Engineering: C*, *61*, 344-350. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.088

Roy, J. J., Abraham, T. E., Abhijith, K. S., Kumar, P. V. S. & Thakur, M. S. (2005). Biosensor for the determination of phenols based on cross-linked enzyme crystals (CLEC) of laccase. *Biosensors and Bioelectronics*, *21*, 206-211. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.08.024

Sapis, J. C., Macheix, J. J. & Cordonnier, R. E. (1983). The browning capacity of grapes. 1. Changes in polyphenol oxidase activities during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *31*, 342-345. https://doi.org/10.1021/jf00116a039

Sarika, C., Rekha, K. & Narasimha-Murthy, B. (2016). Immobilized laccase-based biosensor for the detection of disubstituted methyl and methoxy phenols-application of Box-Behnken design with response surface methodology for modeling and optimization of performance parameters. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *44*(7), 1741-1752. https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1096793

Sarika, C., Rekha, K. & Narasimhamurthy, M. (2015). Studies on enhancing operational stability of a reusable laccase-based biosensor probe for detection of ortho-substituted phenolic derivatives. 3 Biotech, *5*, 911-924. https://doi.org/10.1007/s13205-015-0292-7

Sarika, C., Shivakumar, M. S., Shivakumara, C., Krishnamurthy, G., Narasimha-Murthy, B. & Lekshmi, I. C. (2017). A novel amperometric catechol biosensor based on α-Fe_2O_3 nanocrystals-modified carbon paste electrode. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *45*(3), 625-634. https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1167702

Sassolas, A., Blum, L. J. & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, *30*(3), 489-511. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003

Scheper, T. H., Hilmer, J. M., Lammers, F., Müller, C. & Reinecke, M. (1996). Biosensors in bioprocess monitoring. *Journal of Chromatography A*, *725*(1), 3-12. https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00998-1

Sezgintürk, M. K., Göktuğ, T. & Dinçkaya, E. (2005). Detection of benzoik asit by an amperometric inhibitor biosensor on mushrom tissue homogenate. *Food Technology and Biotechnology*, *43*(4), 329-334.

Shahidi, F. & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects-A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820-897. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018

Sharma, H. & Mutharasan, R. (2013). Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *183*, 535-549. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.137

Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, *349*, 1289-1307. https://doi.org/10.1002/adsc.200700082

Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T. ve Gorton, L. (2005). Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*, *67*(1), 115-124. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2005.02.004

Shrivastava, A. & Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, *2*(1), 21-25.

Singh, M., Verma, N., Garg, A. K. & Redhu, N. (2008). Urea biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *134*, 345-351. https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.04.025

Streffer, K. (2002). Highly Sensitive Measurements of Substrates and Inhibitors on the Basis of Tyrosine Sensors and Recycling Systems. *Postdam University, Thesis of PhD.*

Su, J., Fu, J., Wang, Q., Silva, C. & Cavaco-Paulo, A. (2018). Laccase: A green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. *Critical Reviews In Biotechnology*, *38*(2), 294-307. https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354353

Sultana, B. & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempeferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*, *108*, 879-884. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.053

Svancara, I., Vytras, K., Barek, J. & Zima, J. (2001). Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *31*(4), 311-345. https://doi.org/10.1080/20014091076785

Svancara, I., Vytras, K., Kalcher, K., Walcarius, A. & Wang, J. (2009). Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis*, *21*, 7-28. https://doi.org/10.1002/elan.200804340

Syam, R., Davis, K. J., Pratheesh, M. D., Anoopraj, R. & Joseph, B. S. (2012). Biosensors: A novel approach for pathogen detection. *VETSCAN*, *7*, 14-18.

Tan, Y., Deng, W., Ge, B., Xie, Q., Huang, J. & Yao, S. (2009). Biofuel cell and phenolic biosensor based on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film. *Biosensors and Bioelectronics*, *24*, 2225-2231. https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.11.026

Tang, H. R., Covington, A. D. & Hancock, R. A. (2003a). Structure-activity relationships in the hydrophobic interactions of polyphenols with cellulose and collagen. *Biopolymers*, *70*, 403-413. https://doi.org/10.1002/bip.10499

Tang, H. R., Covington, A. D. & Hancock, R. A. (2003b). Synthesis and spectroscopic characterization of polygalloyl esters of polyols: Models for gallotannins. *Journal-Society of Leather Technologists and Chemists*, *87*, 179-188.

Tang, L., Zeng, G., Liu, J., Xu, X., Zhang, Y., Shen, G., Li, Y. & Liu, C. (2008). Catechol determination in compost bioremediation using a laccase sensor and artificial neural networks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *391*, 679-685. https://doi.org/10.1007/s00216-008-2049-1

Tanigawa, T., Watabe, Y., Kubo, T. & Hosoya, K. (2011). Determination of bisphenol A with effective pretreatment medium using automated column-switching HPLC with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, *34*(20), 2840-2846. https://doi.org/10.1002/jssc.201100418

Telefoncu, A. (Ed.) (1999). *Biyosensörler*. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları.

Timur, S., Odacı, D., Dinçer, A., Zihnioğlu, F., Telefoncu, A. & Gorton, L. (2007). Sulfhydryl oxidase modified composite electrode for the detection of reduced thiolic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *125*, 234-239. https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.02.025

Torrecilla, J., Mena, M. L., Yanez-Sedeno, P. & Garcia, J. (2007). Quantification of phenolic compounds in olive oil mill wastewater by artificial neural network/laccase biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 7418-7426. https://doi.org/10.1021/jf0703351

Tunalier, Z., Koşar, M., Öztürk, N., Başer, K. H. C., Duman, H. & Kırımer, N. (2004). Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species. *Chemistry of Natural Compounds*, *40*, 206-210. https://doi.org/10.1023/B:CONC.0000039124.83109.ac

Uhrovčík, J. (2014). Strategy for determination of LOD and LOQ values-some basic aspects. *Talanta, 119*, 178-180.

Urquiaga, I. & Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, *33*(2), 89-96. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602000000200004

Ünal, M. U., Şener, A., Şen, K. & Yılmaztekin, M. (2015). Seasonal variation in amino acid and phenolic compound profiles of three Turkish white wine grapes. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 39*, 984-991.

Ünal, Y. D. & Kaşıkara-Pazarlıoğlu, N. (2011). Production and gelatin entrapment of laccase from *Trametes versicolor* and its application to quantitative determination of phenolic contents of commercial fruit juices. *Food Biotechnology, 25*(4), 351-368. https://doi.org/10.1080/08905436.2011.617258

Vakıl-Nasliyan, M. (2012). *Çeşitli Dokulardan Aldoz Redüktaz Enziminin, İzolasyon ve İmmobilizasyonu*. (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Vargas-Bernal, R., Rodriguez-Miranda, E. & Herrera-Perez, G. (2012). *Pesticides-Advances in Chemical and Botanical Pesticides*. InTech.

Vasilescu, I., Eremia, S. A. V., Kusko, M., Radoi, A., Vasile, E. & Radu, G.-L. (2016). Molybdenum disulphide and graphene quantum dots as electrode modifiers for laccase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics, 75*, 232-237. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.051

Vastarella, W. (2001). Enzyme Modified Electrodes in Amperometric Biosensors. *University of Degli Studi di Bari, Thesis of PhD*.

Verma, N. & Bhardwaj, A. (2015). Biosensor technology for pesticides-A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 175*(6), 3093-3119. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1489-2

Verrastro, M., Cicco, N., Crispo, F., Morone, A., Dinescu, M., Dumitru, M., Favati, F. & Centonze, D. (2016). Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a screen-printed electrode by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation. *Talanta, 154*, 438-445. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.072

Vidal, L., Chisvert, A., Canals, A., Psillakis, E., Lapkin, A., Acosta, F., Edler, K. J., Holdaway, J. A. & Marken, F. (2008). Chemically surface-modified carbon nanoparticle carrier for phenolic pollutants: Extraction and electrochemical determination of benzophenone-3 and triclosan. *Analytica Chimica Acta, 616*(1), 28-35. https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.011

Vladimis, Y., Gualandi, I. & Tonelli, D. (2017). Amperometric biosensors based on reduced GO and MWCNTs composite for polyphenols detection in fruit juices. *Journal of Electroanalytical Chemistry, 799*, 285-292. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.06.012

Wang, J. (2006). Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics, 21*(10), 1887-1892. https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.10.027

Wood, D. A. (1980). Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology*, *117*, 327-338. https://doi.org/10.1099/00221287-117-2-327

Xu, F., Shin, W., Brown, S., Wahleithner, J. A., Sundaram, U. M. & Solomon, E. I. (1996). A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1292*, 303-311. https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00210-3

Xu, G., Ye, X., Liu, D., Ma, Y. & Chen, J. (2008). Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuyou) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(5), 382-389. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.003

Yao, H., Li, N., Xu, J. Z. & Zhu, J. J. (2007). Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin in gelatine film modified glassy carbon electrode. *Talanta*, *71*, 550-554. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.04.025

Yarar, S. (2014). *Lizin Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu*. (Doktora Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Yashas, S. R., Shivakumara, B. P., Udayashankara, T. H. & Krishna, B. M. (2018). Laccase biosensor: Green technique for quantification of phenols in wastewater (A review). *Oriental Journal of Chemistry*, *34*(2), 631-637. http://dx.doi.org/10.13005/ojc/340204

Yılmaz, Y. & Toledo, R. T. (2004). Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science and Technology*, *15*, 422-433. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.04.006

Yu, J., Vasanthan, T. & Temelli, F. (2001). Analysis of phenolic acids in barley by highperformance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4352-4358. https://doi.org/10.1021/jf0013407

Yu, L. & Zhou, K. (2005). Antioxidants properties of bran extracts from 'Platte' wheat grown at different Iocations. *Food Chemistry*, *90*, 311-316. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.007

Zand, R., Jenkins, D. J. A. & Diamandis, E. P. (2002). Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *Journal of Chromatography B*, *777*, 219-232. https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00213-1

ÖZGEÇMİŞ

Berkay ERGENE ilk, orta ve lise öğrenimini Edirne'de tamamladı. 2013 yılında Trakya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde okumaya hak kazandı ve 2018 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl, Trakya Üniversitesi Uygulamalı Bilimler ve Teknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve halen devam etmektedir.