



**ENZİM TEMELLİ AMPEROMETRİK LAKTAT  
BİYOSENSÖRÜ ÜRETİMİ VE TAYİN SINIRININ  
BELİRLENMESİ**  
**Özüm ÖZOĞLU**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENZİM TEMELLİ AMPEROMETRİK LAKTAT BİYOSENSÖRÜ ÜRETİMİ  
VE TAYİN SINIRININ BELİRLENMESİ**

**Özüm ÖZOĞLU**

Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU  
(Danışman)

Doç. Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ  
(İkinci Danışman)  
(Ankara Üniversitesi)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2019

## TEZ ONAYI

Özüm ÖZOĞLU tarafından hazırlanan “ENZİM TEMELLİ AMPEROMETRİK LAKTAT BİYOSENSÖRÜ ÜRETİMİ VE TAYİN SINIRININ BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU  
**İkinci Danışman** : Doç. Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ

**Başkan** : Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU  
Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Prof. Dr. Nurcan DEĞİRMENCİOĞLU  
Bandırma 17 Eylül Üniversitesi, Bandırma  
M.Y.O., Gıda Teknolojisi Programı Anabilim  
Dalı

İmza

**Üye** : Doç. Dr. Arzu AKPINAR BAYİZİT  
Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

20.2.2019

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

15/02/2019

  
**Özüm ÖZOĞLU**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ENZİM TEMELLİ AMPEROMETRİK LAKTAT BİYOSENSÖRÜ ÜRETİMİ VE TAYİN SINIRININ BELİRLENMESİ Özüm ÖZOĞLU

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU  
**İkinci Danışman:** Doç. Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ

Laktat (laktik asit), doğal olarak laktik asit bakterileri tarafından üretilmekte; yoğurt, turşu ve şarap gibi fermente gıda maddelerinde bulunmaktadır. Bu nedenle gıdaların izlenmesinde, raf ömrünün, tazeliğinin ve kalite özelliklerinin belirlenmesinde oldukça önemli bir parametredir. Ayrıca laktat, anaerobik metabolizmanın temel metaboliti olup insanlarda yorgunluğun ve hidrasyonun, septik şok hastalarında çoklu organ yetmezliği ve ölümün, felç ve laktik asidozun belirtecidir. Bu nedenle laktat seviyesinin belirlenmesi ve izlenmesi; gıda endüstrisinde sürdürülebilir tarım açısından gıda güvenliğinin sağlanması, sağlık alanında ise hasta sağlığının takibi ve hızlı müdahale açısından oldukça büyük bir öneme sahiptir. Bu amaçla; laktat seviyelerinin belirlenmesi ve izlenmesi için hızlı, kolay uygulanabilir, hassas ve ekonomik analitik cihazlar olan biyosensörler, geleneksel yöntemler yerine oldukça tercih edilmektedir. Laktat tayinine yönelik kullanılan ticari ve laboratuvar ölçekli biyosensörlerin büyük bir çoğunluğu enzim temelli ve amperometrik transduserli biyosensörlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda, 31-350  $\mu\text{M}$  tayin aralığına sahip; yani oldukça düşük miktarlardaki laktat miktarlarını belirleyebilen gıda ve sağlık alanında kullanıma uygun enzim temelli ve amperometrik transduserli laktat biyosensörü tez kapsamında üretilmiştir. Bu amaçla, öncelikle optimum şartlar ön denemelerle belirlenmiştir. Ardından; nafyon (%5 wt) ile çalışma elektrot yüzeyine immobilize edilmiş laktat oksidaz enziminin, laktadı oksitlemesi sonucu oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den kaynaklı elektronun, elektrot yüzeyine ulaşmasıyla meydana gelen akım sayesinde laktat miktarını belirleyen biyosensör tasarlanmıştır. Bu biyosensör; camsı karbon elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve platin karşıt elektrot olmak üzere üçlü elektrot sisteminden oluşmaktadır. Daha sonra; üretilen bu biyosensör ile Ankara'nın farklı bölgelerinden temin edilen peynir, sucuk ve kefir numunelerinden izole edilen ve Gram pozitif oldukları belirlenen 23 laktik asit bakterisinin ürettiği laktik asit miktarı tespit edilmiştir. Aynı örnekler için HPLC analizleri yapılarak sonuçlar karşılaştırılmış ve üretilen biyosensörün gerçek örneklerdeki ölçüm sonuçları incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** biyosensör, laktat, elektrokimyasal, gıda, sürdürülebilir tarım  
2019, vii + 65 sayfa.

## ABSTRACT

MSc Thesis

### PRODUCTION OF ENZYME BASED AMPEROMETRIC LACTATE BIOSENSOR AND DETERMINATION OF LIMIT OF DETECTION

Özüm ÖZOĞLU

Bursa Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

**Supervisor:** Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU

**Second Supervisor:** Assoc. Prof. Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ

Lactate (lactic acid) is naturally produced by lactic acid bacteria, which is found in fermented foods such as yogurt, pickle and wine. Thus, it is a very important parameter for monitoring foods, determining their shelf life, freshness and quality characteristics. Also, lactate is a main metabolite of anaerobic metabolism and indicator of fatigue and hydration in humans, multiple organ failure and death in septic shock patients, stroke and lactic acidosis. Therefore, determining and monitoring the lactate level; is of a great importance to ensure food safety in terms of sustainable agriculture in the food industry and monitoring of patient health and rapid intervention in the field of health. For this aim; biosensors which are quick, easy to apply, sensitive and economic analytical devices for the determination and monitoring of lactate levels, are pretty preferred instead of conventional methods. The commercial and laboratory-scale biosensors used for lactate determination are commonly enzyme-based and amperometric transducer biosensors. In the light of these information, the enzyme-based amperometric transducer lactate biosensor, with a determination range of 31-350  $\mu\text{M}$  which can detect too low lactate amount, and suitable for use in the food and health field, has been produced within the scope of this thesis. For this purpose, the biosensor was designed after determination of the optimum conditions with preliminary trials, for determination of lactate amount according to oxidation the lactate by lactate oxidase enzyme immobilised with nafion (5% wt) on working electrode was resulted an electron to flow from the  $\text{H}_2\text{O}_2$ , then there was been a current. Furthermore, the biosensor has been triple electrode system which contented glassy carbon electrode, Ag / AgCl reference electrode and platinum counter electrode. After these; lactate amount produced by 23 lactic acid bacteria, which were isolated from samples of cheese, Turkish sausage and kefir that were provided by different area in Ankara and determined of Gram positive, were measured with the produced biosensor. HPLC analyzes were performed for the same samples and the results were compared with the results of the biosensor's and measurement results of the biosensor in the real samples were examined.

**Key words:** Biosensor, lactate, electrochemical, food, sustainable agriculture  
**2019, vii + 65 pages**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi BAP 17H0415001nolu ve “Elektrokimyasal Laktat Biyosensörü Üretimi ve Tayin Sınırının Belirlenmesi” konulu BAP projesinin genişletilmiş bir bölümüdür.

Akademik çalışmalarında bilgi birimi ve emekleriyle desteklerini benden esirgemeyen ve bu çalışma konusunu yüksek lisans tezi olarak tamamlamama olanak sağlayan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Mihriban KORUKLOĞLU’ na; yüksek lisans eğitimimin başlangıcından itibaren bilgi birimi ve emekleriyle desteklerini benden esirgemeyen ve bu araştırma konusunu yüksek lisans tezi olarak öneren saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ’ a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında; bilgi birikimleri, deneyimleri ve laboratuvar destekleri ile çalışmayı tamamlamam konusunda özveriyle yardımcı olan ve destek veren saygıdeğer hocalarım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Aytekin UZUNOĞLU ve Sayın Dr. Öğretim Üyesi Mehmet GÜMÜŞTAŞ’ a; bu araştırma konusuna yönelmemi sağlayan ve çalışma süresince bilgi birikimleri ve deneyimleriyle benden desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Dr. Mehmet Altay ÜNAL’ a; çalışmalarımın başlangıcında bilgi birikimleri ve deneyimleri ile destek olan ve laboratuvarlarında çalışmama fırsat tanıyan saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Sibel ÖZKAN ve Sayın Dr. Sevinç KURBANOĞLU’ na teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak tüm yaşamım boyunca benden sevgi, emek ve desteklerini esirgemeyen canım ailem; babam Vahap ÖZOĞLU, annem Gülseren ÖZOĞLU ve kız kardeşim Umay ÖZOĞLU’ na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özüm ÖZOĞLU  
15/02/2019

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Biyosensörün Tanımı ve Tarihçesi.....	4
2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....	9
2.2.1 Biyolojik Tanımlayıcı Elementine Göre Biyosensörler.....	11
2.2.2 Fiziksel Transduserlerine Göre Biyosensörler.....	15
2.3. Laktat Biyosensörleri.....	19
2.3.1. Laktat Biyosensörlerinin Gıda Endüstrisindeki Yeri ve Sürdürülebilir Tarım Açısından Önemi.....	22
2.3.2. Laktat Biyosensörlerinin Sağlık Alanındaki Yeri.....	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Morfolojik Olarak Tanımlanması.....	32
3.2 Biyosensör ve HPLC Analizleri için İzole Edilen LAB'nden Metabolit Eldesi.....	32
3.3 Amperometrik Laktat Biyosensörünün Üretimi, Tayin Sınırının Belirlenmesi ve Gerçek Örneklerde Denenmesi.....	33
3.3.1. Enzim İmmobilizasyonu.....	33
3.3.2. Elektrotların (Biyosensörlerin) Hazırlanışı.....	33
3.3.3. Performans Analizleri.....	34
3.3.4. İzole Edilen LAB Tarafından Üretilen Laktat Miktarının Geliştirilen Biyosensör ile Tayini.....	34
3.4. İzole Edilen LAB Tarafından Üretilen Laktat Miktarının HPLC ile Tayini.....	34
3.4.1. Laktik Asit Miktarının Belirlenmesi.....	34
3.4.2. Standart Solüsyonların Hazırlanması.....	35
3.4.3. Kromatografik Koşullar.....	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Karakterleri.....	36
4.2. Elektrokimyasal Sensörün Optimizasyonu.....	37
4.3. Sensörlerin Elektrokimyasal Özelliklerinin Anlaşılması.....	38
4.4. Sensörlerin Laktik Asit Karşısındaki Davranışları.....	41
4.5. Geliştirilen Biyosensör ile İzole Edilen LAB Tarafından Üretilen Laktat Miktarının Tayini.....	45
4.6. HPLC ile İzole Edilen LAB Tarafından Üretilen Laktat Miktarının Tayini.....	46
5. SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	64



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler Açıklama

$^{\circ}\text{C}$	Celcius
m	Mili
$\mu$	Mikro

### Kısaltmalar Açıklama

A	Amper
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
Ar-Ge	Araştırma ve Geliştirme
CA	Kronoamperometre
CV	Döngüsel voltametri
DNA	Deoksiriboz nüleik asit
cm	Santimetre
dk	Dakika
Gr (+)	Gram pozitif
Gr (-)	Gram negatif
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPO	Yaban turbu peroksidazı
LAB	Laktik asit bakterileri
LDH	Laktat dehidrogenaz
LOD	Laktat oksidaz
mL	Mililitre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
M	Molar
$\text{NAD}^+/\text{NADH}$	Nikotinamid adenin dinükleotid
Pt	Platin
UV	Ultraviyole
V	Volt

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Şematik olarak biyosensörlerin çalışma prensibi.....	4
Şekil 2.2. Biyosensörlerin sınıflandırılmasının şematik gösterimi.....	10
Şekil 4.1. Farklı koşulların denendiği başarısız olan ön denemelerin kronoamperometrik (CA) ölçüm sonuçları.....	38
Şekil 4.2. Geliştirilen biyosensörlerin CV sonuçlarına göre elektrokimyasal davranışları.....	39
Şekil 4.3. CV sonuçlarına göre tarama hızının biyosensörlerin elektrokimyasal özellikleri üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.4. Düzenli aralıklarla 50 µM laktik asit eklenmesi sonucu akımda meydana gelen değişim.....	42
Şekil 4.5. Akım-zaman grafikleri sonucu elde edilen kalibrasyon eğrisi (n=3).....	43



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Ticari amaçla kullanılan bazı laktat biyosensörleri .....	<b>21</b>
Çizelge 2.2. Gıda endüstrisinde ticari olarak kullanılan bazı laktat biyosensörleri .....	<b>26</b>
Çizelge 4.1. Bakteri izolatlarının kökenleri, Gram reaksiyonları ve morfolojik özellikleri .....	<b>36</b>
Çizelge 4.2. İzole edilen LAB'nden elde edilen laktat miktarının geliştirilen biyosensör ile belirlenmesi .....	<b>45</b>
Çizelge 4.3. İzole edilen LAB'nden elde edilen laktat miktarının HPLC ile belirlenmesi .....	<b>46</b>



## 1. GİRİŞ

Günümüzde başta gıda olmak üzere kimya, çevre, biyoteknoloji ve sağlık alanlarındaki en büyük sorun; kalite güvencesi ve proses kontrolleri için yapılan periyodik analizlerin oldukça yorucu, uzun zaman alan ve deneyimli çalışan gerektiren tekniklerle yürütülüyor olmasıdır. Örneğin gıda sanayiinde, analizlerin büyük çoğu; kromatografi, spektrofotometri, elektroforez, titrasyon ve mikrobiyolojik ekimler gibi tekniklerle gerçekleştirilmektedir. Bunun sonucunda gıda kompozisyonunda bulunan çok sayıdaki bileşenin konsantrasyonlarını veya örneğin mikrobiyotasını belirlemek uzun zaman almaktadır. Bu nedenle hızlı, hassas, güvenilir, küçük, kolay taşınabilir ve ekonomik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada biyosensör teknolojisi; küçük ve düşük maliyetli cihazlarla biyolojik sistemlerin hassas ve özgül olarak çalışmasını sağlayarak geleneksel analitik yöntemlere güçlü bir alternatif olmaktadır (Scheller ve Schubert 1992, Canh 1993, Mello ve Kubota 2002, Moser ve ark. 2002, Velasco-Garcia ve Mottram 2003, Aykut ve Temiz 2006, Viswanathan ve Radecki 2008, Thakur ve Ragavan 2013).

Biyosensörlerin, ekonomik cihazlar olmaları oldukça önem arz etmektedir. Tran Minh Canh'ın 1993 yılında yayımlanan "Biyosensör" isimli kitabına göre; Japonya'nın, biyosensör araştırma ve geliştirme (Ar-Ge) alanında, kitabın yayınlandığı dönemde dünyaya hakim olduğu, Japonya'da biyosensör pazarının yaklaşık olarak 1,5 milyon yen olduğu belirtilmektedir. Aynı yayında, Japonya'yı takiben Almanya ve diğer Avrupa ülkelerinin (İngiltere, Fransa, İtalya ve İspanya) de biyosensör alanındaki araştırmalara aktif olarak katıldıkları ifade edilmektedir. Ayrıca biyosensörlerin güvenilirliğinin artışının ve maliyetindeki azalmanın aynı yönde ilerlediği, bunun sonucunda biyosensörlerin ilgili sektörlerle daha fazla yayılmasını ve yeni uygulamalara ilgi duyulmasını sağladığı belirtilmiştir (Canh 1993). Global Industry Analysts'in 2014 Kasım ayında yayınladığı rapora göre, yeni teknolojilerin ortaya çıkması, şeker hastalığı gibi sağlık konularını yönetme ihtiyacının artması ve yeni uygulama alanlarından gelen güçlü talep nedeniyle 2020 yılında biyosensörlerin global pazarının 20,7 milyar ABD dolarına ulaşması beklenmektedir (Market Research Report Collections - www.strategyr.com 2014).

Biyosensörler; biyolojik bir materyal, tanımlayıcı moleküller olarak biyolojik türetilmiş bir materyal ya da biyomimik (biyolojik tanımlayıcı element-biyoreseptör), fizikokimyasal transduser (dönüştürücü) ya da dönüştürme etkili mikrosistemlerle entegre edilerek kullanılan analitik cihazlardır (Tothill 2001). Biyosensörler, kavramsal olarak yeni bir gerçek-zaman yaklaşımını, yerinde ve aynı zamanda birden fazla biyolojik zararlı ajanın tespitini temsil etmektedir (Viswanathan ve Radecki 2008).

Biyosensör terimini ilk defa kullanan Clark ve Lyons (1962), glukoz sensörü olarak kullanılmak üzere enzim-elektrot kompleksini üretmişlerdir (Clark ve Lyons 1962). Bu tarihten sonra biyosensör alanında olağanüstü gelişmeler söz konusu olmuştur (Luong ve ark. 1997, Thévenot ve ark. 2001, Kulkarni ve ark. 2014, Bahadır ve Sezgintürk 2015).

Biyosensör araştırma ve gelişmelerinin daha çok sağlık, çevre uygulamaları ve gıda endüstrisine doğru yönelim gösterdiği görülmektedir (Velasco-Garcia ve Mottram 2003). Özellikle patojen belirleyici biyosensörlerin; sağlık, askeri, gıda-tarım ve çevreyle ilgili endüstri alanlarında giderek artması beklenmekte olup uygun pazar payı da bulunmaktadır (Canh 1993, Alocilja ve Radke 2003). Biyosensörlerin yaygın olarak tercih edildiği gıda ve sağlık sektörleri ele alındığında laktat miktarının hızlı tespit edilmesi ve izlenmesi, sürdürülebilir tarımın bir gerekliliği olarak gıda güvenliği ve güvenilirliği açısından; gıdaların kalite, stabilite ve raf ömürlerinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olması ve izlenebilirliği sağlaması, sağlık açısından ise; hepatik hastalıklar, kanama ve solunum yetmezliği gibi durumlarda önem taşıdığı için bu alanlarda laktat tayinine yönelik biyosensörlerin kullanımı büyük önem arz etmektedir (Opara 2003, Carvalho 2006, Cebeci 2006, Tsai ve ark. 2007, Rassaei ve ark. 2013, Casero ve ark. 2014, Rathee ve ark. 2016, Gökırmaklı ve Bayram 2018). Endüstride kullanılan veya çalışma yapılan laktat biyosensörlerinin çoğunun enzim temelli amperometrik biyosensörler olduğu görülmektedir (Luong ve ark. 1997, Bahadır ve Sezgintürk 2015, Rathee ve ark. 2016).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmada, laktat oksidaz (LOD) enziminin immobilizasyonuna dayanan enzim temelli amperometrik laktat biyosensörü üretilerek tayin sınırları belirlenmiş ve geliştirilen cihaz, çeşitli fermente gıdalardan izole edilip morfolojik olarak

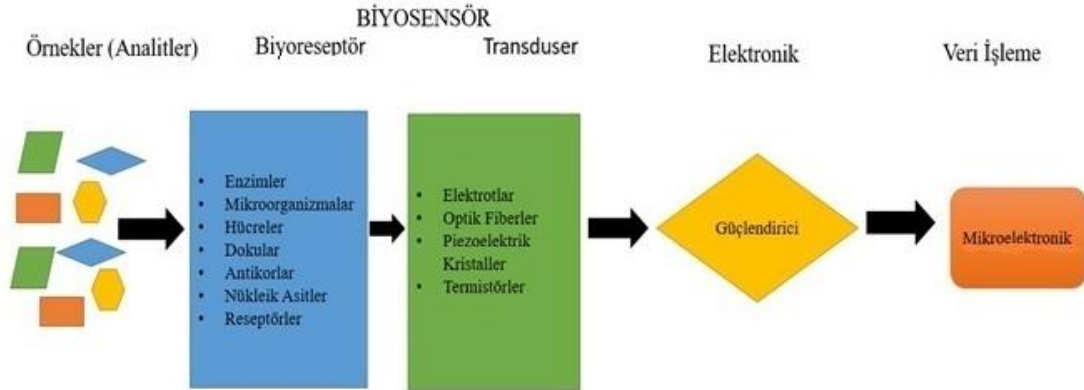
tanımlanan laktik asit bakterilerinin (LAB) ürettikleri laktat miktarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Sonuçlar, yaygın kullanılan bir yöntem olan HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) metodu ile kıyaslanmıştır.



## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1 Biyosensörün Tanımı ve Tarihçesi

Biyosensör, örnek içinde bulunan analitin konsantrasyonunu ya da aktivitesini belirlemek için transduserle biyoreseptörün birleşimini içeren cihazı ifade etmektedir (Rustagi ve Pravesh Kumar 2013). Biyosensörlerde hedef analitin konsantrasyonu, transduserden biyoreseptörün spesifikliğı ve konsantrasyonu ile orantılı olarak elde edilen sinyal aracılığıyla belirlenmektedir. Bu sinyal; proton konsantrasyonundaki değışiklikler, amonyak ya da oksijen gibi gazların salınması veya yükseltgenmesi, ışık emisyonu, absorpsiyon ya da reflektans, ısı emisyonu ya da kütle değışikliğinin sonucu olarak oluşmaktadır. Sinyal, dönüştürücü tarafından akım, potansiyel, sıcaklık değışimi, ışık absorpsiyonu gibi ölçülebilir cevaplara ya da elektrokimyasal, termal, optik ya da piezoelektrik kütle artışına dönüştürülebilmektedir. Sinyal, gelecekteki çalışmalar için güçlendirilebilmekte, işlenebilmekte ve depolanabilmektedir. Prensip olarak herhangi bir reseptör, uygun olan herhangi bir transduserle operasyonel bir biyosensör üretmek için birleştirilebilir (Junhui ve ark. 1997, Aykut ve Temiz 2006). Biyosensörlerin çalışma prensibi şematik olarak Şekil 2.1.'de gösterilmektedir (Velasco-Garcia ve Mottram 2003, Özoğlu ve ark. 2017).



Şekil 2.1. Şematik olarak biyosensörlerin çalışma prensibi

Biyosensörler, temelde biyoreseptör ve transduser olmak üzere iki ana bileşenden oluşmaktadır. Biyoreseptör; analitin tanınmasından ve büyük ölçekte sensörün spesifikliğı ve hassasiyetinden sorumlu kısmı oluşturmaktadır. Biyoreseptörler, belirli bir substrata bağlanabilecek özellikte olup enzim, tüm hücre ve biyoaffinite temelli olmak

üzere 3 grup altında toplanmaktadır (Mehrvar ve ark. 2000, Aykut ve Temiz 2006, Thakur ve Ragavan 2013). Biyosensörlerin transduser kısmı ise; sinyalin, tanımlayıcı sistemin (biyoreseptörlerin) çıkış alanından genellikle elektriksel alana iletilmesini sağlamaktadırlar (Thévenot ve ark. 2001).

Biyosensörlerin başarılı bir şekilde çalışabilmeleri için aşağıda belirtilen bazı önemli özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Chaplin ve Bucke 1990, Leonard ve ark. 2003, Thakur ve Ragavan 2013):

1. Seçicilik: Biyosensör cihazı, hedef analit için yüksek seçiciliğe sahip olmalı ve benzer kimyasal yapılara sahip kısımlara hiçbir şekilde çapraz reaktivite göstermemeli ya da minimum düzeyde göstermelidir. Biyokatalistler de hedef analiz için yüksek spesifikliğe sahip olmalı, kolorimetrik enzim şeritleri ve daldırmalı seviye ölçme çubukları hariç normal depolama koşulları altında stabil olmalı ve fazla sayıdaki analizlerde de iyi bir stabilite göstermelidir.

2. Hassasiyet: Reaksiyonun, karıştırma, pH ve sıcaklık gibi kontrol edilebilir fiziksel parametrelerden bağımsız olması gerekmektedir. Biyosensör cihazıyla ölçüm yapılırken örneklerin ön temizliği gibi ön muamele işlemlerinin olabildiğince az düzeyde tutulması gerekmekte dolayısıyla fazla basamak olması istenmemektedir. Eğer reaksiyon koenzim ya da kofaktörler içeriyorsa, bunların tercihen enzimle birlikte ko-immobilize halde bulunması gerekmektedir.

3. Yanıtların Doğruluğu: Yanıtların; kesin, hassas, seyreltme ve konsantrasyon olmadan yararlı analitik aralığın üzerinde tekrarlanabilir ve doğrusal olması gerekmektedir. Ayrıca elektriksel gürültüden arındırılmış olması gerekmektedir.

4. Sinyal Yanıtlarının Tekrarlanabilirliği: Aynı konsantrasyonlara sahip örneklerin, birden fazla kez analiz edildiklerinde her seferinde aynı sonucu vermeleri gerekmektedir.

5. Hızlı Tepki Süresi ve İyileşme Süresi: Biyosensörün etkin bir şekilde çalışabilmesi için hedef analitin gerçek zamanlı izlemesinde yeterince hızlı sürede cevap vermesi



gerekmektedir. Biyosensörün yeniden kullanılabilirliği için iyileşme süresinin kısa olması gerekmektedir.

6. İşlevsellik: Biyosensör, klinik durumların invaziv izlemesi için kullanılacaksa probunun herhangi bir toksik ya da antijenik etkiye sahip olmaması, ufak ve biyoyumlu olması gerekmektedir. Eğer, fermentörlerde kullanılacaksa steril edilebilir olması gerekmektedir. Tercihen otoklavlanabilmelidirler ancak hiçbir biyosensör enzimi bu derece şiddetli ıslak-ısı muamelesine dayanamayabilir. Her iki durumda da biyosensörlerin kirlenme ya da proteoliz eğilimi olmaması gerekmektedir.

7. Kararlılık (Stabilite) ve Çalışma Ömrü: Farklı biyokimyasal ve çevresel şartlarda biyolojik komponentlerin çoğu kararlı özellik göstermemektedirler. Bu nedenle biyolojik elementlerin aktivitelerinin uzun süre muhafaza edilebilmeleri için arayüz edilerek kullanılması gerekmektedir. Bu sayede biyosensörler pazarlanabilir ve pratikte alanında faydalı olarak kullanılabilir hale gelmektedir.

8. Kullanıcı Dostu Olma: Biyosensörlerin; ucuz, küçük, taşınabilir ve yarı kalifiye operatörler tarafından kullanılacak düzeyde olması gerekmektedir.

Leland Charles Clark Jr. biyosensör çalışmalarının öncüsü olarak bilinmektedir (Renneberg ve Lisdat 2006; Thakur ve Ragavan 2013). Clark, kalp ve akciğer makinelerindeki ven ve arter kan döngüsünün oksijen gerilimini düzenli izlemenin gerekliliğini belirtmektedir. Uzun yıllar boyunca kalp ve akciğer makinelerinde kan oksijen gerilimini gözlemleyebilmek için polarografik yöntemler kullanılmıştır. Ancak bu yöntem, uzun süreler boyunca çalışacak ve sürekli mutlak oksijen gerilimi kaydı tutacak bir cihazı gerekli kılmaktadır. Bu nedenle Clark ve arkadaşları çıplak bir platin katodu ve üzeri selofan kaplanmış katodun ikisiyle birlikte dış referans anotları kullanarak eski katodlardan daha iyi bir şekilde ilerleme kaydettikleri kandaki kısmi gazların gerilimini ( $pO_2$  ve  $pCO_2$ ) ve kanın pH değerini ölçen bir elektrot geliştirmişlerdir (Oksijen Elektrodu) (LC 1956). Bu gelişmenin ardından Clark ve Lyons, hidrofobik membran ve dializ membran, glukoz oksidaz enzimi (GOD) ve  $pO_2$  elektrot kullanarak

kandaki glukoz içeriğini hassas bir şekilde ölçebilen bir enzim elektrot sistemi geliştirmişlerdir (Clark ve Lyons 1962).

Updike ve Hicks 1967 yılında Clark ve Lyon'un enzim elektrot sistemini temel alarak; ürün formasyonunu ya da ayraç tüketimini izleyerek analit konsantrasyonunu ölçen ilk amperometrik biyosensörü geliştirmişlerdir (Mello ve Kubota 2002, Thakur ve Ragavan 2013).

1969 yılında Guilbault ve Montalvo, amonyum iyonlarına cevap verebilen bir Beckman katyonik cam elektrodunun üzerine ince bir film immobilize üreaz yerleştirerek yaptıkları için üre elektrodu adını verdikleri substrat üre miktarını belirleyen üre dönüştürücü geliştirerek ilk potansiyometrik enzim elektrodunu tanımlamışlardır (Guilbault ve Montalvo 1970).

Mindt ve Racine (Hoffmann la Roche) 1973 yılında ilk laktat sensörünü geliştirmeyi düşünmüşlerdir. Yine 1973 yılında Guilbault ve Lubrano, platinyum elektrotta hidrojen peroksidin belirlenmesine dayanarak glukoz ve laktat enzim sensörünü tanımlamışlardır (Palleschi ve ark. 1990, Renneberg ve Lisdat 2006, Thakur ve Ragavan 2013).

1974 yılında Klaus Mosbach ve Bengt Daniellsson, ısı sensörünü matris bağlayıcı enzim preparasyonunun yanına yerleştirerek ve sıcaklık ölçüm birimiyle bağlantılı olan, enzim aktivitelerinin çevresinde meydana gelen sıcaklık değişimlerini direk ölçen ısı hassasiyetli enzim sensörünü yani termistörü geliştirmişlerdir (Mosbach ve Danielsson 1974).

Enzim elektrot sisteminin geliştirilmesinden bir süre sonra Yellow Springs Instruments (YSI), Clark ve Lyon'un enzim elektrot sistemini geliştirerek amperometrik olarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) belirleyen glukoz analiz cihazını (YSI23006) 1975'te piyasaya sürmüşlerdir. Aslında firma ilk olarak 1973 senesinde biyosensör cihazını piyasaya sürse de parazit sorunu nedeniyle geri çekilmek zorunda kalmıştır. Sorunu gidermek amacıyla ilave bir membran eklenerek yani sandeviç membran yöntemini geliştirerek (enzim, nükleopor polikarbonat membran ve sellüloz asetat membran arasında tutularak)

özölmesiyle 1975 yılında ilk biyosensör cihazının piyasaya sürölmesi gerçekleştirilmiştir (Renneberg ve Lisdat 2006, Thakur ve Ragavan 2013, Yegane 2015). 1975 yılında biyosensörler, Divies'in etanol analizi için oksijen prob ve *Acetobacter xylinum*'un selölözik pelikölünün kombinasyonuyla mikrobiyal elektrodu tasarlamasıyla yeni bir evrim geçirmişlerdir (Divies 1975).

Clemens ve arkadaşları 1976 yılında bir elektrokimyasal glukoz biyosensörü, yapay bir pankreas yatağında birleştirmişlerdir. Ardından bu sensör, Biyostatör olarak Miles Laboratuvarları tarafından pazarlanmıştır (Renneberg ve Lisdat 2006, Thakur ve Ragavan 2013).

1976 yılında La Roche (İsviçre) tarafından polarize platin elektrot üzerine küçük bir reaksiyon odasında sitokrom b2 yerleştirilmiş ilk enzim elektrot temelli laktat biyosensörü (Lactate Analyzer LA 640) geliştirilmiştir (Scheller ve Schubert 1992, Malhotra ve Chaubey 2003, Thakur ve Ragavan 2013).

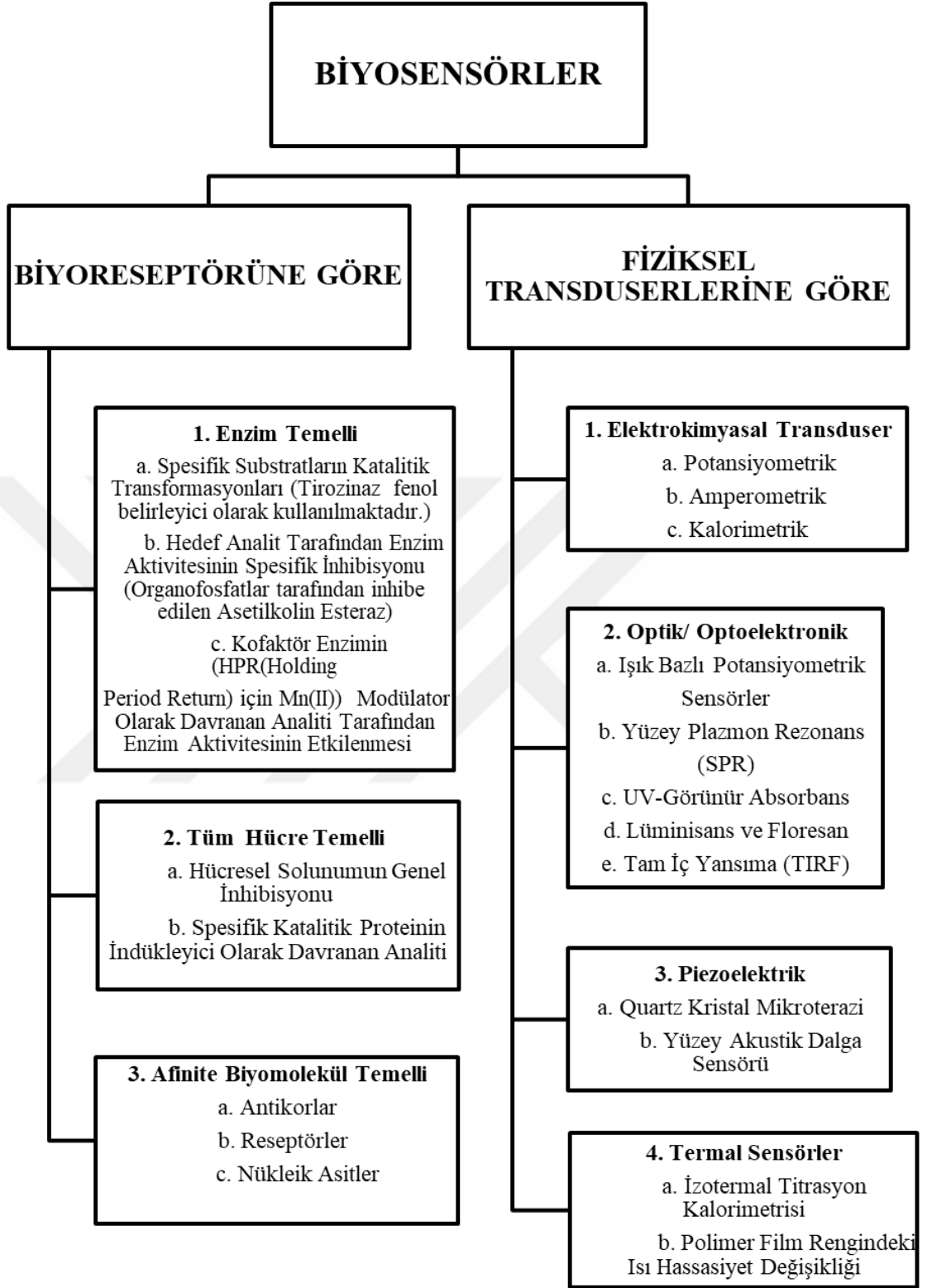
1983 yılında, Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance-SPR) tekniğı geliştirilerek kimyasal sensörler alanına yeni bir optik teknik kazandırılmıştır (Liedberg ve ark. 1983).

1984 yılında Turner ve arkadaşları, düşük maliyetli enzim elektrotların üretimi için immobilize aracı (mediyatör) olarak ferrosen ve türevlerinin oksidoredüktazlarla kullanımını hakkında bir bildiri yayınlamışlardır. Bu hali, MediSense tarafından 1987'de Amerika Cambridge'de piyasaya sürölen kalem ölçer sayacıyla birlikte evde kandaki glukozun izlenmesini sağlayan ekran baskılı enzim elektrodun temelini oluşturmuştur (Thakur ve Ragavan 2013).

## 2.2 Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, çalışma prensipleri dikkate alınarak biyoreseptörü ve fiziksel transduserlerine göre iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Biyosensörlerin bu iki ana sınıfa göre detaylı şekilde sınıflandırılması Şekil 2.2’de gösterilmektedir ( Thakur ve Ragavan 2013, Özoğlu ve ark. 2017).





Şekil 2.2. Biyosensörlerin sınıflandırılmasının şematik gösterimi

## 2.2.1 Biyolojik Tanımlayıcı Elementine Göre Biyosensörler

### Enzim Temelli Biyosensörler

Biyoreseptör olarak enzimlerden yararlanan biyosensörler, en çok çalışma yapılan alanı temsil etmektedirler. Enzimler; yüksek seçicilikleri ve substrata yönelik aktiviteleri nedeniyle biyolojik aktif materyal olarak kullanılabilen en iyi materyallerdir. Başlangıçtaki reaksiyon hızları nedeniyle enzimler, çoğunlukla substratların konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda pek çok biyokimyasal reaksiyon spesifik enzimler tarafından katalizlenmektedir. Bu nedenle enzimler, biyosensörlerde katalitik bileşen olarak geniş anlamda kullanılmaktadırlar. Enzimler, biyosensörlerde yalnız bir şekilde katalitik eleman olarak kullanılabilirdiği gibi alternatif olarak antikor gibi diğer bileşenlerle birleşerek belirteçlerde sinyal yükseltici olarak da kullanılabilirler. Enzim temelli biyosensörlerin çoğunda enzim olarak oksidoredüktazlar kullanılmakta ve bu oksidoredüktazların da yaygın olarak iki alt sınıfı olan oksidaz ve dehidrojenazlar kullanılmaktadır (Chaplin ve Bucke 1990, Wilson ve Hu 2000, Tothill 2001, Choi 2004, Rustagi ve Pravesh Kumar 2013, Rathee ve ark. 2016). Bir enzim temelli biyosensörün konsepti; sensör yüzeyinin yakınına enzim yerleştirilmesine dayanmaktadır. Enzimatik temelli cihazlarda biyosensör, substratın konsantrasyonunu sensör yüzeyindeki enzimatik reaksiyonlara göre belirlemektedir. Reaksiyon iki benzer prosesle kontrol edilmektedir. Bunlar; substrattaki enzimatik dönüşüm ve ürünün enzim katmanından difüzyonudur (Turner 2015, Rathee ve ark. 2016).

Enzim temelli biyosensörler, enzim elektrodunun icadından beri (Clark ve Lyons (1962)) çeşitli potansiyel uygulama alanları nedeniyle giderek artan bir şekilde dikkatleri çekmektedir. Enzim temelli biyosensörler; biyotıp, çevre, gıda kalite kontrol, tarım ve ilaç endüstrilerinde çeşitli hedef analitlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde oldukça önemli bir tekniktir. Pratik ve ticari açıdan 4 tip enzim temelli biyosensör yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar; glukoz (diyabetin tanı ve tedavisi, gıda bilimi, biyoteknoloji), laktat (spor hekimliği, yoğun bakım, gıda bilimi, biyoteknoloji), üre (klinik uygulamalar)

ve glutamat / glutamin (gıda bilimi, biyoteknoloji) biyosensörleridir (Wilson ve Hu 2000, Zhao ve Jiang 2010, Ispas ve ark. 2012).

Enzimlerin; pH, sıcaklık, iyonik kuvvet gibi özelliklerinin kararlılık göstermemesinden dolayı biyosensörlerde kullanımı sınırlandırılmaktadır. Bu nedenle enzim temelli biyosensörler tasarlanırken enzimlerin aktivitelerini sürdürmeleri için uygun ortam sağlanmaya çalışılır. Bu ortam, biyokatalizörün destekle birleştirilmesi ya da biyokatalitik dönüşümün immobilize materyallerle genişletilmesi şeklinde sağlanabilmektedir (Göpel ve Heiduschka 1995, Tothill 2001, Choi 2004, Zhao ve Jiang 2010, Rustagi ve Pravesh Kumar 2013).

Enzim immobilizasyonu, enzimin substrat ve ürünler için olandan farklı bir faza (matris / destek) bağlanmasıdır. Diğer bir ifadeyle enzim immobilizasyonu; enzimlerin fiziksel olarak sınırlandırılmasını ya da katalitik aktivitelerinin alıkonulmasıyla belirli bir alana yerleştirilmesini; tekrar ve sürekli olarak kullanılabilirliğini ifade etmektedir. İmmobilizasyon, enzimin üründen kolayca ayrılmasını sağlamaktadır ve bundan dolayı ürünün protein kontaminasyonu en aza indirilmekte veya tamamen önlenmektedir. Aynı zamanda immobilizasyon, enzim ve ürünlerin maliyetini azaltmaktadır. Enzim immobilizasyonunda farklı materyaller kullanılmaktadır. Bu materyaller; jel matriks, membran formunda polimerik veya inorganik katı, partikül veya mikroküre formundadırlar (Aksoy ve ark. 1998, Datta ve ark. 2012, Brena ve ark. 2013, Uygun ve ark. 2013, Mohamad ve ark. 2015).

İmmobilizasyon metodu; biyolojik materyalin niteliği, kullanılan dönüştürücünün çeşidi, analitin fizikokimyasal özellikleri, biyosensörün çalışması için gerekli koşullar gibi faktörlere bağlıdır ve tüm bu hususların sağlanması; biyolojik elemanın, immobilize mikro ortamında maksimum aktivite göstermesi için gereklidir (Zhao ve Jiang 2010). Enzim immobilizasyon metodları aşağıda özetlenmiştir (Singh ve ark. 2008, Zhao ve Jiang 2010, Datta ve ark. 2012, Mohamad ve ark. 2015);

1) Adsorpsiyon: İmmobilize enzim hazırlamanın en basit ve hızlı yoludur. Enzim adsorpsiyonu, fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Fiziksel

adsorpsiyon Van der Waals bağları nedeniyle zayıfken, kimyasal adsorpsiyon kovalent bağları içerdiği için daha sağlamdır.

2) Tutulma ve Kapsül İçine Alma: Hassas bir işlemdir. Enzimlerin destekleyici jeller ya da lifler içinde tutulduğu dönüştürülemez bir metottur. Bu yöntem reaksiyon gecikmesine neden olacak şekilde substratın difüzyonuna engel oluşturabilmektedir. Bunun yanında jel içindeki gözenekler yoluyla biyoaktivite kaybı da meydana gelebilmektedir.

3) Kovalent Bağlanma: Kovalent bağlanma, geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonu için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu metotta bağlar, biyomateryaldeki fonksiyonel grupla destekleyici matriks arasında oluşur.

4) Çapraz Bağlanma: Adsorplanmış biyomateryallerin stabilizasyonu için kullanışlı bir metottur. Substrat çözeltisinin içine enzim kaybını önlemek için destek gerektirmemektedir. Bu yöntemde genellikle biyomateryal kimyasal olarak katı desteğe bağlanmakta ya da çapraz bağlayıcı ajan gibi bir diğer destek materyali bağlantıyı önemli ölçüde arttırmak için eklenmektedir.

#### Tüm Hücre Temelli Biyosensörler

Önceleri biyosensörlerin pratik uygulamaları glukoz ve pH ölçümleri gibi çok az spesifik örnek ile sınırlandırılmıştır. Biyosensör alanı, biyoreseptör olarak hücreler gibi komplekslerin kullanılmasıyla ilgi çekici bir hal almıştır (Ziegler 2000). Tüm hücre temelli biyosensörlerde; enzimler, proteinler ya da DNA gibi spesifik biyomoleküller yerine tekli mikroorganizmalar veya dokular gibi canlı hücreler kullanılmaktadır (Borisov ve Wolfbeis 2008). Farklı analitlerdeki hücrelerden hücre içi ve dışı elektrik sinyalleri elde etmek için farklı olasılıklar bulunmaktadır. Bunlar; cam pipetlerle hücre dışı iyon kayıtları tutulması, transmembran potansiyelinin izlenmesinin hücre içi kayıtların tutulması ve iyon kanallarının bireysel izlenmesi için patch (yama) kenetleme tekniği veya hücre dışı kayıtlar için mikroelektrotların kullanılmasıdır. Hücre temelli biyosensörler sadece biyolojik olarak aktif ve fonksiyonel analitlere cevap vermektedirler (Göpel ve Heiduschka 1995, Pancrazio ve ark. 1999, Reshetilov ve ark. 2010).



Tüm hücre temelli biyosensörlerde; siyanobakterler, algler, mayalar, mantarlar ve bitki hücreleri gibi farklı tipteki tüm hücreler kullanılmaktadır (Teo ve Wong 2014). Ayrıca tüm hücreler (bakteri, maya, mantar, bitki ve hayvan) genel metabolik durumlarını sorgulayarak biyoreseptör olarak kullanılmaktadırlar. Bu durum genellikle oksijen veya substrat tüketimini, karbondioksit veya metabolitlerin üretimini, bakteriyel lüminesansın tespit edilmesini veya elektron taşıma sistemindeki doğrudan elektrokimyasal örneklerin bulunmasını içermektedir (Murugaboopathi ve ark. 2013).

Biyoreseptör olarak bozulmamış hücre ya da dilimlenmiş doku kullanmanın en az üç büyük avantajı bulunmaktadır. Bunlardan ilki; toksisite, mutajenlik veya farmakolojik aktivite gibi grup etkileri, sensör teknolojisi kullanılarak ölçümlere ulaşılabilir hale gelmektedir. İkincisi; cihazın hassaslığını arttırmak için dahili amplifikasyon basamakları kullanılabilir. Üçüncü bir avantajı ise; tüm hücrelerin kendi kendine yaşamlarını sürdürebilen en küçük canlılar olmasıdır (Ziegler 2000).

#### Afinite Biyomolekül Temelli Biyosensörler

Afinite biyomolekül temelli biyosensörler, sinyal dönüştürücüye arayüz olan antikor, reseptör protein, biyomimetik materyal veya DNA gibi biyoreseptörlerden oluşan ve analit konsantrasyonunu ölçülebilir elektronik sinyallerle ilişkilendirebilen sitokiyometrik bağlanma olayının meydana geldiği analitik cihazlardır. Bu tip biyosensörlerin en büyük avantajı; geniş afinite aralıklarına sahip olmalarıdır. Bu sayede seçici olarak tespit edilebilen analitlerin sayısı artmaktadır. Bu durum özellikle antikorlar algılama tabakası oluşturduklarında doğru olmaktadır (Marcoy ve Barcelo 1996, Rogers 2000, Raba ve ark. 2013).

Afinite temelli biyosensörler, hedef analitteki ayrılmayı azaltmak ve birleşmeyi arttırmak için tasarlanmışlardır. Bu tip sensörler doymuş hale gelmektedirler ve zamanla analit seviyesindeki dalgalanmalar hakkındaki dinamik kinetik bilgiyi sağlayamayabilmektedirler (Liu ve ark. 2012).

Antikor temelli biyosensörler, yüksek afinite özellikleri, çok yönlülükleri ve ticari olarak uygulanabilirlikleri nedeniyle afinite biyomolekül temelli biyosensörlerin en çok kullanılan çeşididir (Rogers 2000).

Reseptör temelli biyosensörlerin yaygın olarak kullanılmadıkları bildirilmektedir. Bunun nedeni; tasarımı zor cihazlar olmaları ve biyolojik reseptör protein ya da dokuların zor elde edilmeleri ile stabil olmamalarıdır (Rogers 2000).

Nükleik asit temelli biyosensörler (DNA temelli biyosensörler olarak da bilinmektedirler), bakteri gibi türlerin immünolojik olarak algılanmalarına alternatif bir yaklaşım olarak gösterilmektedirler. Nükleik asitlerin olağanüstü uzun süreli stabiliteleri ve polinükleotidlerin tamamlayıcı zincirlerinin etkileşiminin yüksek seçiciliği nükleik asit temelli biyosensörlerin avantajıdır (Borisov ve Wolfbeis 2008). DNA afinite bazlı biyosensörler, ön teşhisi, bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve kontrolünü gerçek zamanlı ve yerinde sağlayan cihazlardır. Ayrıca; genetik hastalıkların tanısı, enfeksiyon ajanları ve çevresel durumların saptanması gibi çeşitli potansiyel uygulamaları da kapsamaktadırlar (Rao ve ark. 2011).

Nükleik asit temelli biyosensörler; geleneksel nükleik asit analizlerine göre daha hızlı, daha basit ve daha ucuz bir şekilde sekans spesifik bilgileri elde etmelerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler. Ayrıca ekonomik avantajı dışında, moleküler düzeyde DNA tanıma ve sinyal iletim elemanları arasında arayüz oluşturmak için yenilikçi yöntemler de sunmaktadırlar (Wang 2002).

## **2.2.2 Fiziksel Transduserlerine Göre Biyosensörler**

### Elektrokimyasal Transduserli Biyosensörler

Elektrokimyasal sensörler, analit konsantrasyonu ile orantılı elektrik sinyali üretmek için ilgili analit ile reaksiyona girerek çalışmaktadırlar. Tipik bir elektrokimyasal sensör, algılayıcı elektrot (çalışma elektrodu) ve elektrolitten ayrılmış referans elektrottan oluşmaktadır. Çoğu uygulama için, üç elektrotlu sistem, yüksek girdi empedanslı bir

potansiyostata bağlı referansla kullanılmaktadır ve hem akım hem de devrenin tamamlanması için bir karşıt elektrot kullanılmaktadır. Bu sensörler, enzimler ve hücreler gibi biyolojik komponentlerin aksiyonuyla elektroaktif türlerin üretim ya da tüketimlerinin izlenmesine dayanmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler, özellikle glukoz izlenmesinde yüksek pazar payına sahip biyosensörlerdir (Towseef ve ark. 2013, Hammond ve ark. 2016).

Potansiyometri, duysal analizlerde köklü bir yere sahip olan en eski enstrümental yöntemlerden biridir. Bu analitik teknik, farklı konsantrasyonlarda çeşitli iyonların belirlenmesini sağladığı ve ekonomik ölçüm ekipmanı kullanıldığı için pratik uygulamalarda ilgi çekici bir araçtır. Potansiyometrik biyosensörler, iyon seçici elektrotları biyolojik reaksiyonu bir elektrik sinyaline dönüştürmek için kullanılmaktadırlar. Cam elektrotları, metal oksit esaslı sensörleri ve iyon seçici elektrotları içeren hemen hemen tüm potansiyometrik sensörler piyasada bulunmaktadır. Potansiyometrik biyosensörler; yüksek seçicikleri, düşük maliyetleri ve basit olmaları nedeniyle çevre, sağlık ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Chaplin ve Bucke 1990, Koncki 2007, Meena ve Rajendran 2010, Yin ve Qin 2013).

Amperometrik sensörler, heterojen elektron transfer reaksiyonlarını, yani elektroaktif maddelerin oksidasyonunu ve indirgenmesini temel almaktadırlar (Scheller ve Schubert 1992). Transduser olarak amperometrinin kullanımı yaygındır. Prensip olarak amperometrik biyosensörlerin çalışması; çalışma ve referans elektrot arasında uygulanan sabit potansiyel ile tanımlanmaktadır. Yüklenen potansiyel, net bir akımın akmasına neden olan redoks reaksiyonlarını teşvik etmektedir. Akımın büyüklüğü, çözültide bulunan elektroaktif türlerin konsantrasyonu ile orantılıdır. Hem katodik (indirgeyici) hem de anodik (oksitleyici) reaksiyonlar amperometrik olarak izlenebilmektedir (Towseef ve ark. 2013). Amperometrik biyosensörlerin; çevresel, klinik ve endüstriyel amaçlar için uygun, yüksek hassaslıkta ve güvenilir olduğu bilinmektedir. Clark ve Lyons'un yayınından itibaren, amperometrik biyosensörler popüler ve perspektif eğilimlerden biri haline almıştır (Clark ve Lyons 1962, Meena ve Rajendran 2010, Hammond ve ark. 2016).

Kalorimetrik biyosensörler, biyolojik reaksiyon boyunca üretilen veya tüketilen ısının belirlenmesine yönelik tasarlanmış dönüştürme yöntemine dayanan sensörlerdir. Birçok biyokimyasal reaksiyon, hassas ısı belirleme aygıtları kullanılarak ısının absorpsiyonu ya da üretilmesi eşliğinde verilmektedir (Towseef ve ark. 2013, Kulkarni ve ark. 2014).

### Optik/Optoelektronik Transduserli Biyosensörler

Optik biyosensörler; biyomedikal araştırmalar, sağlık hizmeti, tıbbi ürünler, çevre izlenmesi, ulusal güvenlik ve savaş alanlarında geniş uygulamalara sahip güçlü algılama ve analiz cihazlarıdır. Elektromanyetik parazitlerden etkilenmedikleri, uzaktan algılama yapabildikleri ve tek bir cihazda çoklu algılama sağlayabildikleri ifade edilmektedir. (Fan ve ark. 2008). Bu özellikler, optik biyosensörlerin avantajlarıdır. Optik transduserler; absorbans, floresan/fosforesans, kemilüminesans, reflektans, ışık saçılımı veya kırılma indisindeki değişiklikleri belirleyebilmektedirler (Velasco-Garcia 2009).

Genel olarak belirleme protokolleri; floresan temelli ve etiketsiz belirleme olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Floresan temelli belirlemede, hem hedef hem de biyolojik tanımlayıcı moleküller boyalar gibi floresan etiketleriyle etiketlenmektedirler; floresan yoğunluğu hedef moleküllerin varlığını ve hedefle biyoreseptör arasındaki etkileşimin kuvvetini göstermektedir. Etiketsiz belirlemede ise; hedef moleküller etiketlenmez ya da değiştirilmez ve doğal formlarında belirleme yapılmaktadır. Bu tip belirleme kolay ve ucuzdur ve moleküler etkileşimin kantitatif ve kinetik ölçümüne izin vermektedir (Fan ve ark. 2008, Velasco-Garcia 2009).

Optik sensörler, başlangıçta oksijen, karbondioksit ve pH ölçümleri için geliştirilmiş, sonraları floresan ve ışıldayan optrodların yapımına kadar geliştirilmişlerdir. Seçici biyolojik bileşen, optik fiberin ucundan ve diğer uca yerleştirilmiş uyarı ve belirleme komponentleri immobilize olmuştur (Luong ve ark. 1997).

Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance-SPR), kimyasal algılama alanında optik bir teknik olup, metal yüzeyin optik aydınlatması sırasında ortaya çıkan bir fenomendir ve bu biyomoleküler etkileşim analizi için uygulanabilmektedir. Yüzey

plazmon rezonans için en iyi tanımlama; karşıt yüklü dielektrik sabitlerle iki ortam arasındaki ara yüzeyde yük yoğunluğunun salınımıdır. Plazmonlar, yüzey metal katmandaki uyarılmış serbest elektron kısmını ifade etmektedir. Yüzey plazmon rezonansı uyarılmak için dört temel yöntem bulunmaktadır. Bunlar; prizma kuplajı, dalga kılavuzu kuplajı, fiber optik kuplaj ve ızgaralı kuplajdır. Uygun koşullar altında ince metal filmin yansıtma özelliği, ortamın bir tarafındaki optik farklılıklara karşı oldukça hassastır. Bunun nedeni ise yüzey plazmonlarının sınır koşullarının hassas problemleri olmasıdır (Liedberg ve ark. 1983, Leonard ve ark. 2003, Fan ve ark. 2008).

### Piezoelektrik Transduserli Biyosensörler

Bu tip sensörler, piezoelektrik materyal aracılığıyla dalga yayılımındaki rezonans frekansındaki değişiklik için kullanılmaktadırlar. Bu prensipler, sensör yüzeyindeki kütle, viskozite veya yoğunluk değişimlerini ölçmek için kullanılabilir (Tothill 2001). Piezoelektrik dönüştürücüler, bağışıklık algılama uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tip dönüştürücü kullanmanın avantajları; gerçek zamanlı izleme, etiketsiz belirleme ve kullanım kolaylığı sağlamasıdır. Ancak bu yöntemin hassaslık ve spesifiklik konularında eksikliklerinin bulunduğu da bilinmektedir. Ayrıca piezoelektrik biyosensörlerde format ve kalibrasyon sorunları bulunmaktadır. Bu nedenle piezoelektrik biyosensörler, optik ve elektrokimyasal biyosensörlere göre daha az dikkat çekmektedirler (Luong ve ark. 1997, Mello ve Kubota 2002, Marrazza 2014).

Piezoelektrik etkiden yararlanmak için genel yaklaşım piezoelektrik kristali, antikorlar veya enzimler gibi biyolojik malzemelerle yani hedef molekül için yüksek seçiciliğe sahip bileşiklerle kaplamaktır (Babacan ve ark. 2000). Piezoelektrik kuartz kristal sensörleri basitlikleri nedeniyle biyoanalitik analizler için ve biyomoleküller etkileşimlerin karakterizasyonu için rekabetçi cihazlar olarak büyük önem taşımaktadırlar. Bu biyosensörlerde biyoreseptör kuartz kristalde immobilize haldedir ve bu da harici alternatif elektrik alanının uygulanmalarında rezonans üretmektedir. İki interaktif molekül arasındaki; biri yüzey üzerine immobilize edilmiş ve diğeri çözelti veya gaz fazında serbest olan biyospesifik reaksiyon, gerçek zamanlı olarak takip edilebilmektedir (Marcoy ve Barcelo 1996, Marrazza 2014).

## Termal Transduserli Biyosensörler

Termometrik ölçümler, biyokimyasal reaksiyon sırasında verilen veya absorbe edilen ısının ölçümüyle ilgilidir. Toplam ısı verme veya absorpsiyonu, molar entalpi ile orantılıdır ve biyokimyasal tepkimede yaratılan toplam ürün moleküllerinin sayısıdır. Termal biyosensörler, bu biyolojik reaksiyonların temel özelliklerinden faydalanmaktadırlar (Luong ve ark. 1997, Ramanathan ve Danielsson 2001).

Termal transduserler ayrıca antikor-antijen etkileşimlerinin belirlenmesi için de uygulanmıştır ve bu teknik, Termometrik Elisa Testi olarak da bilinmektedir. Ancak sofistike kullanımı ve pahalı enstrümantasyon bu tekniğin en büyük dezavantajlarıdır (Luong ve ark. 1997).

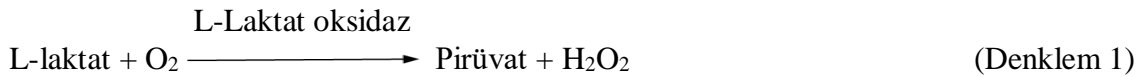
### **2.3 Laktat Biyosensörleri**

Laktat (laktik asit), anaerobik metabolizma yolunun anahtar metabolitidir. Dokuların enerji isteği aerobik solunumla karşılanamadığında anaerobik metabolizma sonucunda laktat konsantrasyonunda artış meydana gelmektedir (Nikolaus ve Strehlitz 2008, Rathee ve ark. 2016).

Laktik asit; L (+) ve D (-) ayna görüntülerine sahiptir. L (+) laktat memeli metabolizmasında ara ürünken; D (-) laktat ise genellikle mikroorganizmalar, algler ve bitkiler tarafından üretilmekte olup insanlar tarafından kullanımı sınırlıdır. Ayrıca bazı mikroorganizmalar; özellikle laktik asit bakterileri, rasemik karışım olarak her iki ayna görüntüsünü de üretmektedirler. Laktat, farklı ortamlardaki L ve D laktik asitlerinin varlığının ya da üretiminin belirlenmesi veya izlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Mazzei ve ark. 1996, Nikolaus ve Strehlitz 2008).

Laktik asitin belirlenmesinde; düşük maliyeti, kullanım kolaylığı, mükemmel hassaslığı ve iyi seçiciliği nedeniyle elektrokimyasal biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde laktat biyosensörlerin çoğu amperometrik transduserli ve enzim temelli

biyosensörlerdir (enzimatik amperometrik biyosensörler). Enzim temelli laktat biyosensörleri içerisinde enzimatik reaksiyonlarının ve tasarımının basit olmasından dolayı en yaygın kullanılan biyosensörler; immobilize laktat dehidrogenazı (LDH) veya laktat oksidazı (LOD) temel alan biyosensörlerdir (Yang ve ark. 1999, Tsai ve ark. 2007, Romero ve ark. 2008, Ibupoto ve ark. 2012, Pérez ve ark. 2012, Sun ve ark. 2015, Rathee ve ark. 2016). Biyosensörlerle laktat belirlenirken temel alınan reaksiyonlar aşağıdaki gibidir (Anzai ve ark. 1998, Monosik ve ark. 2012, Uzunoglu ve ark. 2016a):



Laktat biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik artan ilgi bu analitin biyomarker olarak kullanılma potansiyelinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Hedef analitteki laktat konsantrasyonunun sensörlerle belirlenmesinden; hasta sağlığı koşullarının gözlemlenmesi için klinik teşhislerde, cerrahide sürekli gözlem için hastalık araştırmalarında, spor hekimliğinde, şok/travma vakalarında, gıda endüstrisinde; fermentasyon sürecinin bir göstergesi olarak ve domates sosları, meyveler, meyve suları, şarap ve süt gibi ürünlerin tazelik, stabilite ve depolama kalitesini belirlenmesi amaçlarıyla yaygın olarak faydalanılmaktadır (Tsai ve ark. 2007, Rassaei ve ark. 2013, Casero ve ark. 2014, Rathee ve ark. 2016). Ticari amaçla kullanılan laktat biyosensörlerinin bir kısmı Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Luong ve ark. 2008, Przybyt 2014).

**Çizelge 2.1.** Ticari amaçla kullanılan bazı laktat biyosensörleri

<b>YSI Inc (Ohio, ABD)</b>	YSI 2300 STAT™ Plus Glucose & Lactate Analyzer - Klinik Analizler YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer - Biyoproses Kontrolü, Gıda ve İçeceklerin Analizleri YSI 7100 Multiparameter Bioanalytical System – Biyoanalizler YSI 1500 SPORT™ Lactate Analyzer - Spor Hekimliği
<b>Nova Biomedical (Massachusetts, ABD)</b>	Stat Profile® Critical Care Xpress ve Stat Profile® pHox - Klinik Analizler BioProfile® Analyzers - Biyoproses Kontrolü Lactate Plus – Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
<b>Abbot Laboratories (Illinois, ABD)</b>	i-STAT® - Klinik Analizler (Bakım Noktası ve Acil Servis)
<b>EKF Diagnostic GmbH (Almanya)</b>	Biosen C_Line ve Biosen S_Line - Klinik Analizler
<b>Sens Lab (Almanya)</b>	Lactate SCOUT - Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
<b>ARKRAY (Japonya)</b>	Lactate Pro LT-1710 - Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
<b>Roche Diagnostic (Almanya)</b>	Accutrend® Plus - Klinik Analizler (Bakım Noktası) Accutred® Lactate - Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
<b>DiaSys GmbH (Almanya)</b>	SensoStar - Klinik Analizler
<b>Med-Tronik GmbH (Almanya)</b>	Powerlact® - Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
<b>ApexBio (Tayvan)</b>	The Edge™ - Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
<b>Bio Sensor Technology GmbH (Almanya)</b>	LABTREND – Klinik Analizler LACPRO - Klinik Analizler (Taşınabilir)
<b>Sensolytics GmbH (Almanya)</b>	OLGA (On Line General Analyser) – Biyoproses Kontrolü
<b>Trace GmbH</b>	Labo TRACE - Klinik Analizler TRACE C2 Process TRACE -Biyoproses Kontrolü Multi TRACE
<b>BioFutura s.r.l. (İtalya)</b>	Wine checker “Per Bacco” – Şarap Analizi
<b>Tectronik s.r.l. (İtalya)</b>	Senzytec 1 – Şarap Analizi



### 2.3.1 Laktat Biyosensörlerinin Gıda Endüstrisindeki Yeri ve Sürdürülebilir Tarım Açısından Önemi

Laktat (D(-) ve L(+)) laktik asit); yoğurt, ayran veya peynir gibi fermente süt ürünlerinde; lahana turşusu, salamura zeytin veya Kore Kimchi'si gibi fermente sebze ürünlerinde ve birçok gıda ile içeceklerde bulunmaktadır ve doğal olarak laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedir. Dolayısıyla gıda endüstrisinde laktat seviyesi; fermente süt ürünlerinin, meyve, sebze, et ve şarapların tazelik, stabilite ve kalite özelliklerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Aynı zamanda laktat, asit ya da aroma düzenleyici olarak (E270) ve gıda koruyucusu olarak (sodyum laktat formu) da kullanılmaktadır (Mazzei ve ark. 1996, Nikolaus ve Strehlitz 2008, Pérez ve ark. 2012, Rassaei ve ark. 2013).

Şarap endüstrisinde, malolaktik fermentasyon sırasında malik asit laktik asite dönüşmektedir. Bu fermentasyon, asitin giderilmesini ve şarabın tadının yumuşamasını sağlamaktadır. Bundan dolayı fermentasyon sürecindeki laktik asit seviyesinin izlenmesi şarap kalitesinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Pérez ve ark. 2012, Rassaei ve ark. 2013).

Balık yetiştiriciliğinde, çiftlik verimliliğini artırmak için çok sayıda balık genellikle sınırlı bir alanda yetiştirilmektedir. Bu durum, yaşam kalitesinin düşük olmasına, balıkların strese ve hastalığa maruz kalmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla kandaki laktat seviyesi, gıda güvenliği ve kalitesini sağlamak için deniz ürünleri üretiminde stres işareti olarak kullanılabilir (Smit ve ark. 2010, Rassaei ve ark. 2013).

Bunlar dışında gıda maddelerinde istenmeyen laktat oluşumu da söz konusu olmaktadır. Yumurta sanayiinde, L-laktatta meydana gelen artış kontaminasyon ya da kuluçkadan kaynaklı bozulmaların göstergesi iken UHT sütlerde L-laktat artışı bozulmanın işaretidir. D-laktat, vakum paketli ve dondurulmuş et ürünlerinin tazeliğinin azalmasının ve domates, salça ile domates suyunda bakteri kontaminasyonunun bir göstergesidir. Meyve sularının laktik asit üreten bakterilerle fark edilmeden uzun süre kontamine olması, bakterilerin yayılmasına ve büyük hacimde meyve suyunun enfekte olmasına neden olmaktadır. Bu da meyve suyunun organoleptik özelliklerinin değişmesine ve tüketim

süresinin kısılmasına neden olmaktadır. Şaraplarda da D-laktik asit üretimi, şarabın bozulma göstergesidir (Nikolaus ve Strehlitz 2008, Przybył 2014).

Bu bilgiler doğrultusunda laktatın izlenebilirliği; gıdaların kalite özelliklerinin belirlenmesi ve bozulmaların anlaşılmasında oldukça önem arz ettiği anlaşılmaktadır. Gıdaların izlenebilirliği, gıda güvenliği ve gıda güvenilirliği açısından sürdürülebilir tarımın temel gerekliliklerindedir. Sürdürülebilir tarım kavramı; artan gıda üretimi sonucu tarım politikalarının gelişme göstermesiyle önem kazanmıştır. Sürdürülebilir tarımın gıda güvenliği (gıdanın tüketime uygun olması) ve güvenilirliği (gıdanın nüfusa yeterliliği) açısından önemi ise daha önce belirtildiği gibi izlenebilirlik ile ifade edilmektedir (Thrupp 2000, Horrigan ve ark. 2002, Opara 2003, Turhan 2005, Carvalho 2006, Cebeci 2006, Sanayi Genel Müdürlüğü 2013). İzlenebilirlik sayesinde; herhangi bir istenilmeyen durumla karşılaşıldığında; ürün ve süreçlerin geriye yönelik izlenerek sorunun kaynağının belirlenmesi ve ileriye yönelik izlenerek geri toplama gibi kriz yönetim mekanizmalarının oluşması sağlanmaktadır. Bu faydalarından dolayı izlenebilirlik İyi Tarım Uygulamaları Yönetmeliği'nde de desteklenmektedir (Cebeci 2006, Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2010). İzlenebilirlik kendi içerisinde; ürün, süreç, girdi, genetik, hastalık-kalıntı ve ölçme izlenebilirliği olarak sınıflandırılmaktadır. Ölçümlerin yapılması, kalıntı miktarlarının belirlenmesi ve diğer izlenebilirlik aşamalarında yapılan analizlerin biyosensör gibi hızlı ve ekonomik yeni analitik cihazlarla yapılması sürdürülebilirlik sürecinin hızlı bir şekilde devamı için gerekmektedir (Opara 2003, Turhan 2005, Carvalho 2006, Cebeci 2006, Avcı 2007, Gökırmaklı ve Bayram 2018).

Gıda endüstrisinde kullanım için geliştirilen bazı laktat biyosensörleri kronolojik olarak aşağıda belirtilmiştir:

- 1995 yılında Mazzei ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; tüm domates, doğranmış domates, domates salçası ve domates suyu örneklerinde D(-) ve L(+) laktik asiti belirleyen çoklu enzim biyoelektrodu geliştirmişlerdir. Bu biyosensörün prensibi; L (+) - laktik asit oksidaz (LOD), n (-) - laktik asit dehidrojenaz (D-LDH) ve yaban turbu peroksidazı (HPO) enzimlerinin katalitik aktivitesine dayanmaktadır. Bu üç enzim

amperometrik oksijen seçici elektrodun ucunda immobilize halde bulunmaktadır (Mazzei ve ark. 1996).

- 1997’de Blanco ve arkadaşları elma şarabındaki laktik asit miktarını belirlemek için; glutamik piruvik transaminaz (GPT) ve L-laktat dehidrogenaz (LDH) enzimlerini nikotinamid adenin dinükleotid (NAD +) kofaktörü ile elektrolit polimerize poli (o-fenilendiamin) (PPD) film kullanarak karbon macun içinde immobilize ettikleri reaktifsiz laktat amperometrik biyosensör geliştirdiklerini belirtmişlerdir (Lobo-Castañón ve ark. 1997).

- 1999 yılında Serra ve arkadaşları, şarap ve yoğurt gibi gıda ürünlerindeki L-laktat tayini için kesikli ve akış enjeksiyon modlarını kullanarak; laktat oksidaz (LOD) ve peroksidazın mediyatör ferrosen ile birlikte elektrot matrisi içine dahil edildiği bir bienzim amperometrik grafit-teflon kompozit biyosensör geliştirmişlerdir (Serra ve ark. 1999).

- Yine 1999 yılında Katrlık ve arkadaşları, şaraptaki L-malat ve L-laktat miktarını belirlemek için; 2 heksadekanon, grafit ve NAD gibi hidrofobik iskelete sahip katı bağlayıcı matrisle kapladıkları transduser kullandıkları, L-malat veya L-laktat dehidrogenaz ve diyaforaz enzimlerin diyaliz membran ile kaplanarak transduserin yüzeyine yerleştirdikleri ve aracı olarak Heksasiyanoferrat (III) kullanılan bir biyosensör geliştirmişlerdir (Katrlık ve ark. 1999).

- 2000 yılında Girotti ve arkadaşları daha önce klinik örneklerdeki D- ve L-laktat tayini için geliştirilen biyoluminesan akış sensörünü pH ve dilüsyonunu modifiye ederek bira için geliştirip yayınlamışlardır. Bu biyosensörde; naylonla immobilize edilmiş D- ve L-laktat dehidrogenaz tarafından üretilen azaltılmış nikotinamid adenin dinükleotidini, ayrı bir naylon bobin üzerinde immobilize edilen bakteriyel biyoluminesan enzimler aracılığıyla izlenmektedir (Girotti ve ark. 2000).

- 2001 yılında Avramescu ve arkadaşları şarabın organoleptik özelliklerinin belirlenmesi için D-laktat ve asetaldehit tayin eden ekran baskılı elektrotlara ve NAD<sup>+</sup> bağımlı dehidrojenazlara dayanan biyosensör geliştirmişlerdir (Avramescu ve ark. 2002).
- Kriz ve arkadaşları 2002 yılında, domates püresi ve bebek mamalarındaki çözülmüş L-laktat miktarını; SIRE tabanlı (tanıma elemanının enjeksiyonunu temel alan sensör) biyosensör kullanılarak belirlemişlerdir. Bu biyosensörün ölçme prensibi; bir dahili dağıtım akış sistemine enjekte edilen ve yarı geçirgen bir membran kullanılarak amperometrik transdüser ile doğrudan mekansal temas halinde tutulan az miktarda enzimin kullanımına dayanmaktadır (Kriz ve ark. 2002).
- 2005-2006 yılında Parra ve arkadaşları şarap ve birada laktat tayinine uygun biyosensör tasarlamışlardır. Bu biyosensör, doğrudan adsorpsiyon ve kovalent bağlanma dahil olmak üzere iki farklı stratejiyi kullanarak laktat oksidazın (LOD) immobilizasyonu yoluyla geliştirilmiştir. Ortaya çıkan laktat oksidaz mono tabakalarının karakterizasyonu, atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve kuartz kristal mikrobalans (QCM) teknikleri kullanılarak sulu fosfat tampon çözeltileri içinde gerçekleştirilmiştir (Parra ve ark. 2006).
- 2008 yılında Ballesta-Claver ve arkadaşları laktat için yeni bir kimyasal lüminesans tabanlı tek atışlı biyosensör tanımlamışlardır. Laktat tanıma sistemi, laktat oksidaza (LOD) dayalıdır ve transduksiyon sistemi; bir poliyon kompleks membranda immobilize olan luminol, *Arthromyces ramosus*'tan (ARP) peroksidaz ve metalik alüminyumdan oluşmaktadır (Ballesta-Claver ve ark. 2008).
- Li ve arkadaşları 2008 yılında sütlü içeceklerdeki laktat miktarını ölçmek için; immobilize enzim floresan kapiler analiz (IE-FCA) temelli biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensörde laktik dehidrojenaz (LDH), kapilerin iç yüzeyine glutaraldehit ile immobilize edilmiştir ve laktik asit tayini için immobilize enzim laktat kapiler biyoreaktör (IE-LCBER) oluşturulmuştur (Li ve ark. 2008).
- 2009 yılında Rahman M. M. ve arkadaşları ticari süt ve insan serumu örneklerinde L-laktat konsantrasyonunu belirlemek için; LDH ve NAD<sup>+</sup>'nın birlikte immobilize edildiği

karboksilik asit fonksiyonlu iletken polimer / CNT kompozit filmi temel alınan amperometrik laktat biyosensörü geliştirmişlerdir (Rahman ve ark. 2009).

Gıda endüstrisinde ticari olarak kullanılan önemli laktat biyosensörleri Çizelge 2.2’de verilmiştir (Luong ve ark. 1997, Prodromidis ve Karayannis 2002, Bahadır ve Sezgintürk 2015).

**Çizelge 2.2.** Gıda endüstrisinde ticari olarak kullanılan bazı laktat biyosensörleri

Cihaz	Enzimatik Yol	Analit	Uygulanan Matris	Genel Açıklamalar
YSI 2700 Seçici Gıda Analiz Cihazı	L-Laktat oksidaz	L-Laktat	Et	Otomatik olarak 24 örneğe kadar 10 ile 25 µl örnek büyüklüğü Polimerik membranlar-da immobilizasyon Tipik membran çalışma ömrü 5-21 gün H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> anot oksidasyonu Tepki süresi 1 dk Hassas CV (n 10)% 2
ABD 3000 Biyosensör Analiz Sistemi	L-Laktat oksidaz	Laktat		Polimerik membran-larda enzim immobilizasyonu Lizin oksidazı metalize (Ru / Pd) karbon üzerine immobilize edilir Elektro polimerleştiril-miş poli(o-fenilendiamin) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> anot oksidasyonu veya O <sub>2</sub> katot indirgemesi Tekrarlanabilirlik <% 3 Kararlı durum tepkisi 1-2 dk Depolama ömrü 1-12 ay Analog veya RS-262 çıkışları bulunmakta

**Çizelge 2.2.** Gıda endüstrisinde ticari olarak kullanılan bazı laktat biyosensörleri (Devamı)

Bio Profile Kimya Analiz Cihazı	Detayları bilinmemektedir.	L-Laktat	Hücre kültürü ve fermentasyon prosesinde analitlerin belirlenmesi	Otomatik örnekleme, tam otomatik O <sub>2</sub> katot indirgeme Enzim zarları 0,5 ml numune boyutu Hassasiyet / çözüm% 5
Sycopel Mikrodiyaliz Biyosensörü	Laktat oksidaz	Laktat	Genel uygulamalar	Elektropolimerize poli(o-fenilendiamin) ya elektroaktif türe ait bir moleküler bariyer olarak veya enzimi Pt çalışma elektrodu üzerine immobilize etmek için kullanılmaktadır.
FAIZA 110-P	Detayları bilinmemektedir.	Laktat	Fermentasyon prosesindeki genel uygulamalar	Uygun enzim kartuşu ile donatılmış akış enjeksiyon analizörü. Yanıt süresi 3 dk Tekrarlanabilirlik <% 3 6 örnekteki eş-zamanlı analiz Biyoreaktör ömrü ana-lite bağlı olarak 1500 çalışır veya 6-12 aydır.
LM58 Laktat Analiz Cihazı	Laktat oksidaz	Laktat	Süt ürünleri	Enzim tabanlı biyosensör; Clark tipi amperometrik elektrot kullanılarak O <sub>2</sub> katot indirgemesi Peristaltik akışkan pom-palar Deneye bağlı olarak örnek büyüklüğü 3.5-25 µl Yanıt süresi 20 s Reaktif stabilitesi 6-12 ay 0-5 ° C'de açılmadığı sürece 20 mM'ye kadar laktat

**Çizelge 2.2.** Gıda endüstrisinde ticari olarak kullanılan bazı laktat biyosensörleri (Devamı)

PM-1000, PM-1000DC Analiz Cihazları; M-100, AS-200 Analiz Cihazları	Detayları bilinmemektedir.	Laktat	Gıda analizleri	Clark oksijen elektrotuna enzimatik membranlar İki noktalı kalibrasyon gereklidir Numune boyutu 1 ila 50 µl; CV% 1
Enzim Membranları, Kalın Film Biyosensörü	Laktat oksidaz	Laktat	Genel uygulamalar Bazı analiz cihazları tedarikçisi	Amperometrik enzim sensörü Depolama stabilitesi > 6 ay Operasyonel stabilite > 10 gün veya 2000 analizi
Biosen 5040	Laktat oksidaz	Laktat	Genel uygulamalar	Amperometrik H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> anot oksidasyonu Enzimatik membranlar Numune hacmi 20 µl Ömür boyu 15 gün veya 3000 analiz Yanıt süresi 10-15 s Doğrusal aralık: 0.5-40 mM
PerBaco 2000 PeBaco 2002	Laktat dehidrojenaz	Laktat	Şarap Şıra	Enzimatik; amperometrik Biyokatalizörleri taşıyan katı bağlayıcı matrisler Karışımı önlemek için diyaliz membranları Numunelerin seyreltilmesi ve renk giderilmesi önerilmektedir

### 2.3.2 Laktat Biyosensörlerinin Sağlık Alanındaki Yeri

Anaerobik koşullar altında laktat üretimi, insan performans seviyelerinin, yorulmanın ve hidrasyonun göstergesidir. Yüksek laktat seviyeleri, konjestif kalp yetmezliği, hipoksi ve diyabetik ketoasidoz, iskemi, felç gibi çeşitli tıbbi durumlardan kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, laktatın gerçek zamanlı olarak saptanması, bu gibi tıbbi durumların, travma sonrası durumların izlenmesi ve yorucu bir faaliyete katılan bir kişinin fiziksel durumunun değerlendirilmesinde yararlı olabilmektedir ( Wilson ve Hu 2000, Shah ve ark. 2007).

Laktat, kaslarda anaerobik glikoz metabolizmasından oluşan önemli bir metabolittir. Hücre içindeki proton konsantrasyonunun artışı laktat üretimine eşlik etmektedir. Eğer laktat üretim hızı yeterince artış gösterirse, hücrel proton tampon kapasitesi aşılabılır ve hücrel pH azalır. Bu biyokimyasal olaylara laktik asidoz denilmektedir. Laktik asidozun azalmış doku oksijenasyonuna, sol ventrikül yetmezliğine ve ilaç toksisitesine eşlik ettiği bilinmektedir (Robergs ve ark. 2004, Tsai ve ark. 2007, Rassaei ve ark. 2013).

Laktat analizi; klinik kimyada çok kullanılmamasına karşın şok ve miyokard enfarktüsü tanısı, neonatoloji ve spor hekimliğinde popülaritesi artmaktadır (Scheller ve Schubert 1992).

Septik şok hastalarında, kan laktat düzeylerinin seri olarak belirlenmesi, çoklu sistem organ yetmezliği ve ölümün iyi bir öngörücüsüdür (Bakker ve ark. 1996, Tsai ve ark. 2007). Son yıllarda kan laktat eğrisi ve laktat eşikleri (LT), dayanıklılık performansının teşhisinde önemli hale gelmiştir (Faude ve ark. 2009).

Sürekli bir laktat sensörü; travmatik yaralanmalara sahip askerlerde veya sivillerde kullanıldığında kan kaybı ve hipoperfüzyonu erken fark edilmesine yardımcı olacaktır. Buna ek olarak, laktat sensörleri, yüksek stresli ortamlarda çalışan bireylerin metabolik izlenmelerinde yararlı olacaktır (House ve ark. 2007).

Sağlık alanında kullanım için geliştirilen bazı laktat biyosensörlerinin kronolojik olarak belirtilmesi:

- 1976 yılında La Roche (İsviçre), ilk enzim elektrot temelli laktat biyosensörünü geliştirmiştir ve Lactate Analyzer LA 640 ismiyle piyasaya sürmüştür (Scheller ve Schubert 1992, Malhotra ve Chaubey 2003, Thakur ve Ragavan 2013).
- 1993 yılında Faridnia ve arkadaşları; L-laktatın invazif olmayan tayini için bir amperometrik hidrojen peroksit esaslı biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensör, elektrokimyasal etkileşimleri etkili bir şekilde ortadan kaldırmak için bir polikarbonat



membran ve bir politetrafloroetilen (PTFE) engelleme membranı arasında immobilize olmuş laktat oksidazı kullanmaktadır (Faridnia ve ark. 1993).

- 1993- 1995 yıllarında Kyrolainen ve arkadaşları açık kalp ameliyatı sırasında kan laktatını izlemek için bir çevrimiçi biyosensör sistemi geliştirmişlerdir, Meyerhoff ve arkadaşları kan laktatının sürekli izlenebilmesi için bir kateter temelli taşınabilir biyosensör geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Baker ve Gough implante edilebilir laktat sensörünü tanıtmışlardır (Wang 1999).

- 1997 ve 1998 yıllarında beyin biyosensörleri ile laktat izlemeyi içeren az sayıda da olsa çalışmalar yapılmıştır (Shram ve ark. 1998, Wilson ve Hu 2000, Hu ve Wilson 2002).

- 1999 yılında glikoz ve laktatın akışkan-enjeksiyon analizi için luminolün elektrokemilüminesansı temel alınan fiber-optik biyosensör geliştirilmiştir (Mehrvar ve ark. 2000).

- 2004 yılında Jansen ve arkadaşları; kandaki glukoz ve laktat miktarını ölçebilen bükülmüş tel tabanlı mikroelektrodları tasarlamış ve üretmişlerdir (Ballerstadt ve Gowda 2004).

- pH ve laktatın deride bulunan ve salgılanmış terle atılan analitler olması nedeniyle miktarlarının belirlenmesinin hastalıkların teşhis ve tedavisine yardımcı olabileceği düşünülmüş ve 2006 yılında karbon nanotüp elektrotlara LOD immobilize edilmiş pH ve laktat tayini gerçekleştiren elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmiştir (Weber ve ark. 2006).

- 2008 yılında Rawson ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmayla in vitro hücre metabolizmasının izlenmesi için karbon mikrobant biyosensör vasıtasıyla laktatın elektrokimyasal olarak ölçülmesini sağlamışlardır. Bu çalışma, laktat tayini için ekran baskı teknolojisine dayanan mikrobant biyosensörlerin üretimi ve kullanımı ile ilgili ilk belge özelliği taşımaktadır (Rawson ve ark. 2009).

• 2009 yılında Dungchai ve arkadaşları; serumdaki kritik sağlık göstergeleri olan glukoz, laktat ve ürik asit tayini için ilk elektrokimyasal kağıt tabanlı mikroakışkan biyosensörü tasarlamışlardır (Dungchai ve ark. 2009).

• 2010 yılında Jena ve arkadaşları; müsin / albümin hidrojel matrisinde immobilize edilen laktat oksidaz kullanılan ve laktat miktarını belirleyen bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir (Romero ve ark. 2010).

• 2013 yılında Wang ve arkadaşları; egzersiz olayları sırasında, kullanıcının cildine uyan, esnek basılı bir geçici transfer dövme elektrokimyasal biyosensörünü kullanarak insan terlemesinde gerçek zamanlı noninvaziv laktat algılamasının ilk örneğini göstermişlerdir (Jia ve ark. 2013).

Sağlık sektöründe ticari olarak kullanılan bazı önemli laktat biyosensörleri aşağıda listelenmiştir (Bahadır ve Sezgintürk 2015);

- Yellow Springs Instruments - 13L
- Roche, Basel, İsviçre - LA 640
- Eppendorf, Almanya - ECA 20 (ESAT 6660) ve ACC
- Elite glucometer - Lactate Pro LT-1710
- ApexBio, Tayvan – The Edge
- EKF Diagnostics, ABD - Lactate Pro-2 LT-1730 ve Lactate Scout
- Nova Biomedical, ABD – Lactate Plus

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Morfolojik Olarak Tanımlanması**

Ankara'nın farklı bölgelerinden temin edilen 3 adet peynir, 2 adet sucuk ve 2 adet kefir örneği laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu için kullanılmıştır. Bu amaçla, gıda matrislerinden alınan numunelerden, yayma plak yöntemine göre MRS (De Man Rogosa Sharpe, Merck) ve M17 (Merck) besiyerlerine inokülasyon yapılmıştır. Bakterilerin M17 besiyerinde daha iyi geliştikleri tespit edildikten sonra bakterilerin saflaştırılması ve aktivasyonu için M17 besiyeri ile çalışmalara devam edilmiştir. İzolasyon aşamasında inkübasyon sıcaklığı 30°C ve süresi 24-48 saat olarak uygulanmıştır (Harrigan ve McCance 1976). İzolatların morfolojik tanımlamaları ve Gram reaksiyonları, Gram boyama yöntemi (Norateks Kimya Gram Boyama Seti) ile belirlenmiştir (Gerhardt ve American Society for Microbiology. 1981). Boyama sonuçlarına göre Gr (+) olanlar analizlerde kullanılmak üzere %15 gliserol içeren M17 sıvı besiyerinde, -20°C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2 Biyosensör ve HPLC Analizleri için İzole Edilen LAB'nden Metabolit Eldesi**

Laktik asit miktar tayini amacıyla öncelikle morfolojik olarak tanımlanan LAB'nin izolatları, M17 Broth kullanılarak 30°C'de 24 saat süreyle aktive edilmiştir. Aktif kültür süpernatantı 6000 rpm'de 10 dakika süresince santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant 0.45 µm (Sartorius, Almanya) şırınga ucu filtre kullanılarak steril hale getirilmiştir (Altuntaş ve ark. 2010).

### **3.3 Amperometrik Laktat Biyosensörünün Üretimi, Tayin Sınırının Belirlenmesi ve Gerçek Örneklerde Denenmesi**

#### **3.3.1 Enzim İmmobilizasyonu**

Biyosensör denemeleri ve tasarımında laktat oksidaz (LOD) enzimi (Sigma, L0638-100UN Lactate Oxidase from *Pediococcus* sp., CAS:9028-72-2) biyoreseptör olarak kullanılırken; substrat olarak başlangıçta %90'lık laktik asit (Merck, K48405566 649) ve sodyum laktat (Sigma Aldrich) denenmiş ancak bu substratlar ile başarılı sonuç elde edilememesi nedeniyle daha sonraki denemelerde lityum laktat (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Enzim immobilizasyonu amacıyla gluteraldehit miktarı/yüzdesi, gluteraldehit ile altın nanopartikül karışım miktarı/yüzdesi, nafyon miktarı/yüzdesi ve farklı LOD miktarları ile denemeler yapılarak immobilizasyonun optimizasyonu sağlanmıştır (Yang ve ark. 1999, Ward ve ark. 2004, Romero ve ark. 2008, Sun ve ark. 2015, Rathee ve ark. 2016).

#### **3.3.2 Elektrotların (Biyosensörlerin) Hazırlanışı**

Biyosensörün dizaynı için; screen printed (DS110), ince film, camsı karbon ve platin elektrotlarla deneme yapılmıştır. Denemeler sonucunda camsı karbon elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve platin karşıt elektrottan oluşan 3' lü elektrot sistemi kullanılmıştır.

Elektrokimyasal sensörler damlatma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Öncelikle Pt elektrot yüzeyi alümina parlatma solüsyonları (1  $\mu\text{m}$ , 0.3  $\mu\text{M}$  ve 0.05  $\mu\text{m}$ ) ile parlatılmış ve yüzeyi tamamen temizlemek amacıyla ultra saf su ve etanol içeren karışımda ultrasonik banyo yardımıyla yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulmuş elektrot yüzeyine 2U laktat oksidaz enzimi içeren 10  $\mu\text{L}$  hacme sahip PBS tamponu damlatılmış ve 2 saat oda sıcaklığında bırakılarak kurumaya sağlanmıştır. Sonrasında enzim ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine 8  $\mu\text{L}$  nafyon (% 0.5 wt) çözeltisi damlatılarak kurumaya bırakılmıştır (Optimum immobilizasyon) (Weber ve ark. 2006, Uzunoglu 2016).

### 3.3.3 Performans Analizleri

Hazırlanan biyosensörlerin performans analizleri, döngüsel voltametri (CV) ve kronoamperometri (CA) yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. CV ve CA çalışmaları, GPES yazılım programıyla donanımlı Autolab PGSTAT 30 potansiyostat (Eco-Chemie, Utrecht, Netherlands) ile yapılmıştır. Elektrokimyasal performans deneylerinde hazırlanan sensörler, çalışma elektrotu olarak kullanılmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak ise Pt tel kullanılmıştır. Sensör performans deneyleri ise PBS tamponu (0.01M, 8 mL) içerisinde oda sıcaklığında yapılmıştır. Hazırlanan sensörler kullanılmadıklarında +4°C’de bekletilmiştir (Uzunoglu 2016).

### 3.3.4 İzole Edilen LAB Tarafından Üretilen Laktat Miktarının Geliştirilen Biyosensör ile Tayini

İzole edilen LAB’nden hazırlanan örneklerde bulunan laktik asit miktarı, biyokimyasal özellikleri ve tayin sınırları belirlenen biyosensör ile 3 tekerrürlü olacak şekilde kronoamperometrik olarak ölçülmüştür. Laktik asit miktarı aşağıdaki eşitlikte görüldüğü gibi; akım-zaman grafiklerinden (sayfa 43, Şekil 4.5’teki gibi) elde edilen  $y=ax+b$  şeklindeki denklemde y: akım miktarındaki artışı, a: duyarlılığı, x ise eklenen seyreltik laktik asit konsantrasyonunu göstermektedir. Bu denklemden seyreltik laktik asit konsantrasyonu hesaplanarak, elde edilen konsantrasyonun toplam hacime oranlanmasıyla gerçek laktik asit konsantrasyonu hesaplanmıştır.

## 3.4 İzole Edilen LAB Tarafından Üretilen Laktat Miktarının HPLC ile Tayini

### 3.4.1 Laktik Asit Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen LAB’nden elde edilen süpernatantların (metabolitin) uygun konsantrasyondaki örnekleri, kalibrasyon eşitliğinde yerine yerleştirilerek laktik asit miktarı, özellikleri aşağıda detaylandırılan HPLC ile tespit edilmiştir (Gumustas ve ark. 2013).

### 3.4.2 Standart Solüsyonların Hazırlanması

Laktik asit stok çözeltisi 100 mmol olacak şekilde ultrasaf su ile hazırlanmış ve kalibrasyon amacıyla bu çözelti yine saf su ile 0,25 - 50 mmol (n=5) aralığında seyreltilerek kullanılmıştır.

### 3.4.3 Kromatografik Koşullar

En uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü değerlendirilmiştir. Daha sonra hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi, akış hızı ve sıcaklık etkileri incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda optimum koşullarda kromatografik analizler gerçekleştirilmiştir.

Analizde sabit faz olarak Synergi Polar RP (250 mm x 4,6mm, 5 µm) saptanmış ve bu kolon kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Kolon ömrünü uzatmak ve safsızlıkların analiz üzerine etkisini azaltmak amacıyla koruyucu kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı farklı değerlere getirilerek analiz sonuçlarına sıcaklığın etkisi olup olmadığı incelenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda kolon fırın sıcaklığı 25°C’de sabit tutulmuştur. Analiz kapsamında su ile farklı asitlerin karışımları kullanılarak hareketli faz denemeleri yapılarak etkin bir ayırma sağladığı için % 0.25 (h/h) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> içeren çözelti (pH:2.5) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Hareketli faz çözeltileri vakum altında 0.45 µm por çaplı selüloz asetat filtre kullanılarak süzülümüş, çözünmemiş oksijenin giderilmesi için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. 210 nm’de görüntüleme yapılan sistemde akış hızı denemeleri gerçekleştirilmiş (0,5-1,25 mL/dk) ve en iyi sonuçların elde edildiği 1mL/dk çalışmaların tüm basamakları için kullanılmıştır. Analizler 20 dakikalık kolon şartlanması beklendikten sonra başlatılmıştır. Çalışma kapsamında optimize edilen kromatografik yöntem, Uluslararası Uyum Konseyi’nin (ICH) belirlediği analitik yöntem geçerlilik testleri göz önüne alınarak gerçekleştirilmiştir (ICH Official web site : ICH 2018).

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Bakteri İzolatlarının Morfolojik Karakterleri

Çeşitli gıdalardan izole edilen bakterilerden tamamı (23 adet) Gram (+) reaksiyonu göstermiştir. İzolatların morfolojik karakterleri ve Gram reaksiyonları Çizelge 4.1’ de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Bakteri izolatlarının kökenleri, Gram reaksiyonları ve morfolojik özellikleri

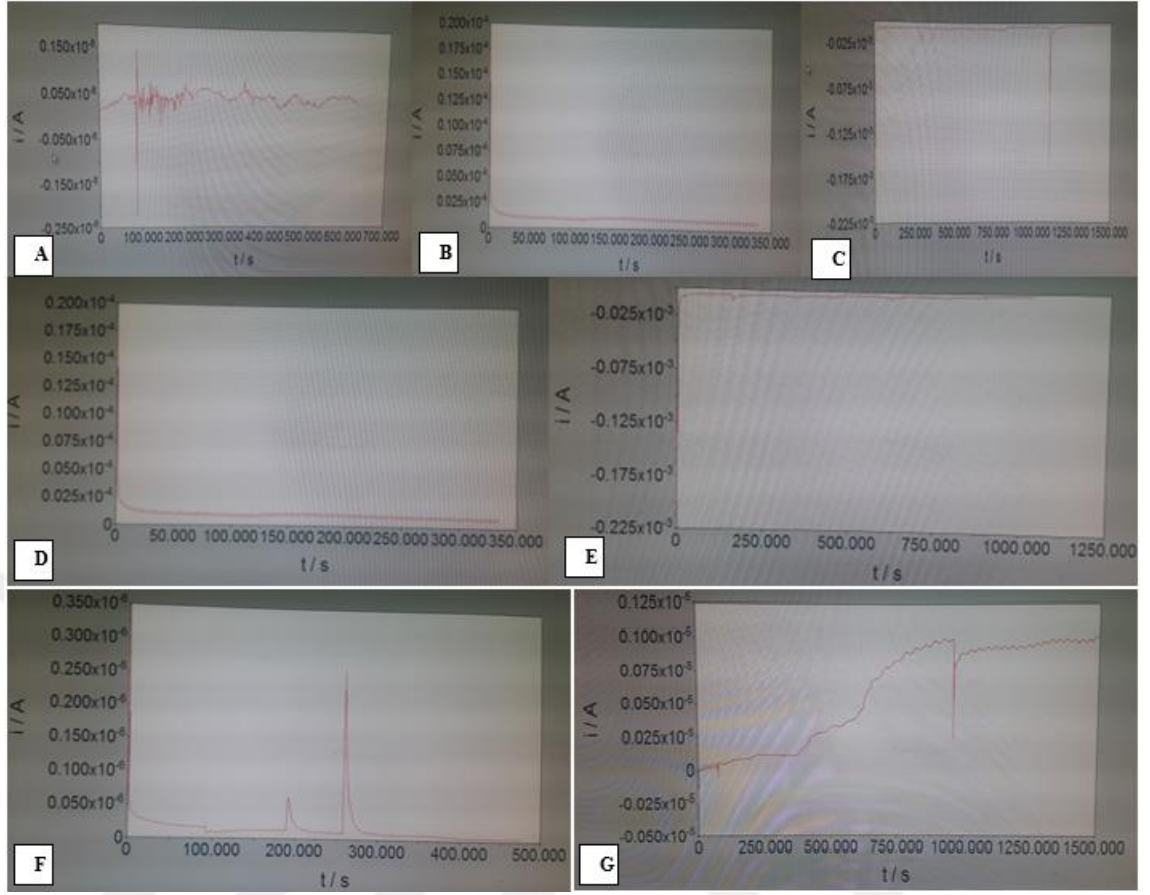
İzolat No	İzole edildiği gıda	Gram reaksiyonu	Morfoloji
11	Peynir	Gr +	Kok
12	Peynir	Gr +	Kok
13	Peynir	Gr +	Kok
14	Peynir	Gr +	Kok
21	Peynir	Gr +	Kok
23	Peynir	Gr +	Kok
24	Peynir	Gr +	Kok
31	Kefir	Gr +	Kok
32	Kefir	Gr +	Kok
33	Kefir	Gr +	Kok
41	Sucuk	Gr +	Kok
421	Sucuk	Gr +	Çubuk
4221	Sucuk	Gr +	Kok
4222	Sucuk	Gr +	Kok
431	Sucuk	Gr +	Kok
432	Sucuk	Gr +	Kok
51	Sucuk	Gr +	Kok
62	Peynir	Gr +	Kok
631	Peynir	Gr +	Kok
632	Peynir	Gr +	Kok
71	Kefir	Gr +	Kok
72	Kefir	Gr +	Kok
73	Kefir	Gr +	Kok

Bu bakteriler Gr (+) reaksiyon göstermeleri ve fermente gıdalardan izole edilmeleri sonucu LAB olarak kabul edilmişlerdir (König ve ark. 2017). Çalışma kapsamında yürütülen biyosensör ve HPLC analizlerinde bu 23 bakterinin metabolitleri tayin edilmiştir. Aynı zamanda bu 23 izolatın laktat üretme yetenekleri de HPLC sonuçları ile doğrulanmıştır.

#### **4.2 Elektrokimyasal Sensörün Optimizasyonu**

Elektrokimyasal sensörlerin damlatma yöntemine göre hazırlanmasından önce literatür taramaları doğrultusunda; farklı elektrotlarda, farklı immobilizasyon yöntemleri ve farklı laktat çözeltileri ile farklı voltlarda kronoamperometrik ölçümler yapılmıştır (Yang ve ark. 1999, Ward ve ark. 2004, Romero ve ark. 2008, Rawson ve ark. 2009, Monošik ve ark. 2012, Pérez ve ark. 2012, Sun ve ark. 2015, Rathee ve ark. 2016). Ancak bu ölçümler, CV alınmadan (elektrot kontrolü yapılmadan / elde referans veri bulundurmadan) yapıldığı ve de substrat olarak kullanılan ticari L-laktat'tan yanıt alınmadığı için başarısız olmuştur. Yapılan bu başarısız denemelere ait sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



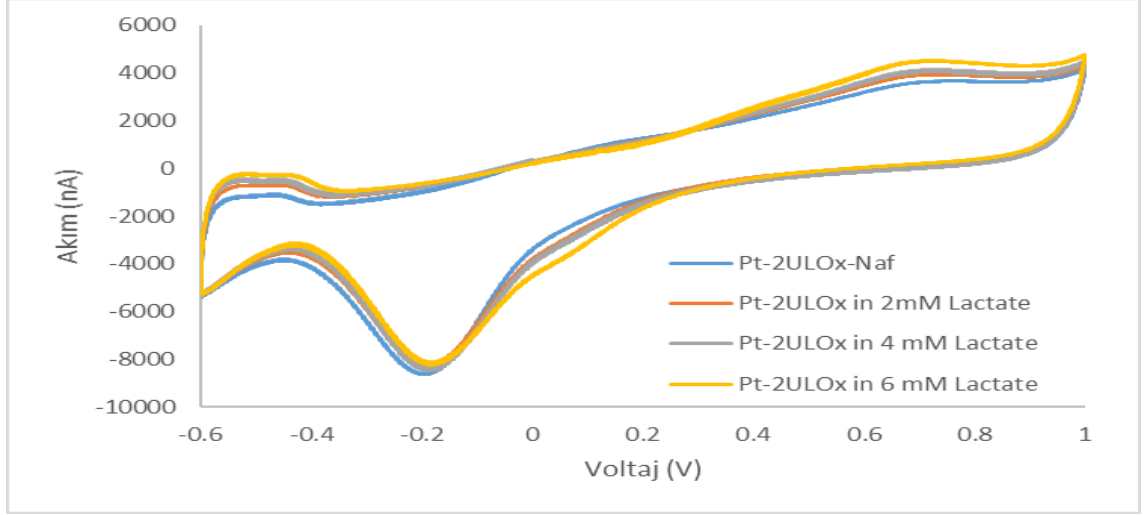


**Şekil 4.1.** Farklı koşulların denendiği başarısız olan ön denemelerin kronoamperometrik (CA) ölçüm sonuçları: **A:** Screen printed elektrot, -450 mV, Gluteraldehit ile immobilizasyonu, **B:** Screen printed elektrot, -200 mV, Gluteraldehit ile immobilizasyonu, **C:** Screen printed elektrot, -700 mV, Gluteraldehit ile immobilizasyonu, **D:** Screen printed elektrot, +700 mV, Gluteraldehit ile immobilizasyonu, **E:** Screen printed elektrot, -700 mV'ta Gluteraldehit + Altın Nanopartikül ile immobilizasyonu, **F:** İnce film screen printed elektrot, +450 mV, Gluteraldehit ile immobilizasyonu, **G:** Screen printed elektrot, +200 mV'ta Nafion ile immobilizasyonu ölçüm sonuçları

Şekil 4.1'deki sonuçlarda görüldüğü üzere, eklenen laktik asit miktarlarına karşın ölçülen akımda pik oluşumu gözlenmemiştir. Bu sebeple CV ölçümleri yapılarak biyosensörlerin davranışları anlaşılabilir ve optimum yanıt alınan voltaj belirlenmiş ve de substrat değiştirilerek doğru ölçümler elde edilmiştir (Bkz. Bölüm 4.3).

### 4.3 Sensörlerin Elektrokimyasal Özelliklerinin Anlaşılması

Damlatma yöntemi ile hazırlanan biyosensörlerin elektrokimyasal davranışları döngüsel voltametri kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.2' de verilmiştir.

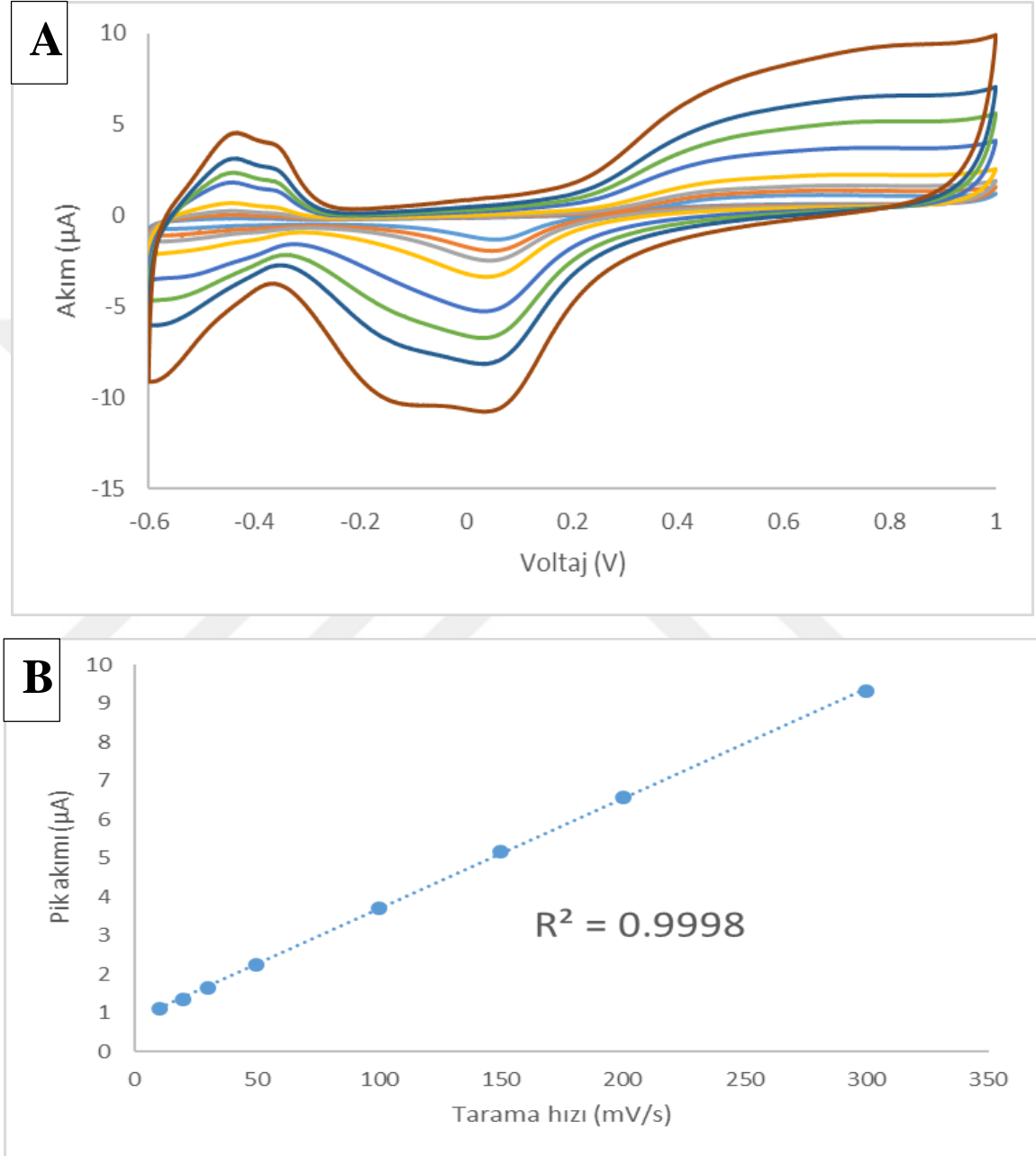


**Şekil 4.2.** Geliştirilen biyosensörlerin CV sonuçlarına göre elektrokimyasal davranışları.

Şekil 4.2’den anlaşıldığı üzere PBS çözeltisi içerisine 2 mM laktat eklenmesi ile 0,4 V’ tan itibaren oksitlenme pikinde bir artış gözlemlenmektedir. PBS içerisindeki laktik asit oranı artırıldıkça (4 ve 6 mM laktik asit için) oksitlenme pikinin daha da arttığı görülmüştür. Sisteme laktik asit eklenmesi sonucu oksitlenme pikinde meydana gelen değişme; elektrot üzerine tutuklanmış enzim tabakasının çalıştığını yani laktik asitin oksitlendiğini göstermektedir. Laktik asitin, laktat oksidaz enzimi yardımıyla oksitlenme denklemi “2.3 Laktat Biyosensörleri (Sayfa 20)” başlığı altında ifade edilen Denklem 1’ de görülmektedir. Denklem 1’ de verilen reaksiyon laktik asitin oksitlenmesi ile ürün olarak hidrojen peroksit ve piruvatın ortaya çıktığını göstermektedir. Oluşan hidrojen peroksit, elektrot yüzeyine ulaştığında eğer uygun bir potansiyel var ise oksitlenme reaksiyonu vermekte ve açığa elektron çıkmaktadır. Bu nedenle Şekil 4.2’ de görülen oksitlenme akımında artışın sebebi hidrojen peroksidin sensör yüzeyinde oksitlenmesinden kaynaklanmaktadır. Denklem 1 ve 2 dikkate alındığında, sistemde bulunan laktik asit ile reaksiyon sonucu oluşan ve de sensör yüzeyinde oksitlenen hidrojen peroksit konsantrasyonu arasında bir bağıntı bulunmaktadır. Verilen bu bilgiler, hidrojen peroksit miktarının ve konsantrasyonun belirlenmesiyle ortamda bulunan laktik asit miktarının hesaplanabileceğini göstermektedir.

Biyosensörlerin diğer önemli elektrokimyasal özelliklerinden birisi de sensör yüzeyinde meydana gelen reaksiyonların yüzey veya difüzyon kontrollü olup olmadığıdır.

Hazırlanan biyosensörlerin bu özelliğini belirlemek amacıyla değişik tarama hızlarında CV deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler 2 mM laktik asit varlığında PBS çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.3' te gösterilmiştir.



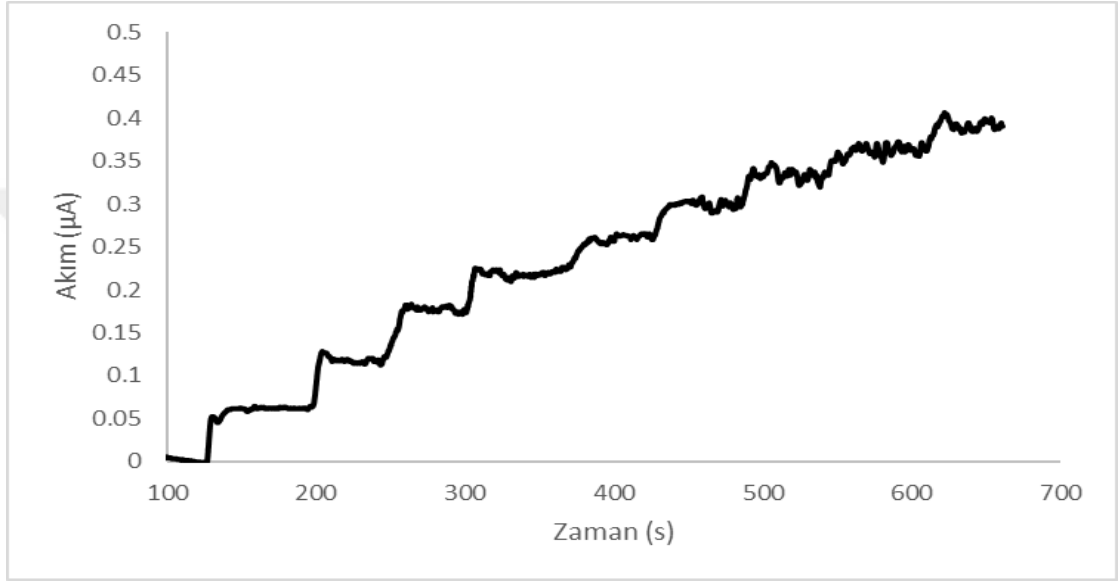
**Şekil 4.3** CV sonuçlarına göre tarama hızının biyosensörlerin elektrokimyasal özellikleri üzerine etkisi **A:** CV ölçümlerinde akımın voltaja göre değişimi, **B:** Pik akımında meydana gelen değişimin tarama hızı ile olan bağlantısı

Şekil 4.3A'dan anlaşıldığı üzere CV deneyinde kullanılan tarama hızının artışıyla elde edilen grafik üzerinde özellikle pik akımı üzerinde önemli derecede değişim meydana gelmiş ve oksidasyon pikleri daha belirgin hale gelmiştir. Meydana gelen bu değişimin tarama hızı ile olan bağlantısı Şekil 4.3B' de gösterilmektedir. Görüldüğü üzere pik akımının artan tarama hızı ile doğrusal bir artış gösterdiği belirlenmiştir ( $R^2 = 0,9998$ ). Elde edilen bu veriler doğrultusunda sensör yüzeyinde meydana gelen reaksiyonun yüzey kontrollü olduğu sonucu çıkarılmaktadır. Yani hazırlanan sensörlerin performansları, elektrokatalitik yüzey özelliklerine önemli derecede bağımlılık göstermektedir. Bu da elektrot yüzeyi herhangi bir nanomateryal ile kaplanmadığı için beklenen bir durumdur. Eğer yüzey, bir nanomateryal ile kaplanırsa; reaktanların yüzeye difüzyon hızı ve ürünlerin yüzeyden uzaklaşması, yüzeyde meydana gelen reaksiyonlardan daha yavaş gerçekleşeceği için meydana gelen reaksiyonun da difüzyon kontrollü olacaktır (Çelik 2014, Uzunoglu 2016, Uzunoglu ve ark. 2016b). Örneğin; Uzunoğlu ve arkadaşları (2016) yapmış oldukları çalışmada, PdAg/indirgenmiş grafen oksit temelli yani nanokompozit içeren elektrokimyasal  $H_2O_2$  biyosensörü geliştirmişlerdir. Biyosensörün tarama hızı incelendiğinde; PdAg / rGO sensörlerinin yüzeyinde  $H_2O_2$  azalmasının difüzyon kontrollü olduğu gözlenmiştir (Uzunoglu ve ark. 2016a).

#### **4.4 Sensörlerin Laktik Asit Karşısındaki Davranışları**

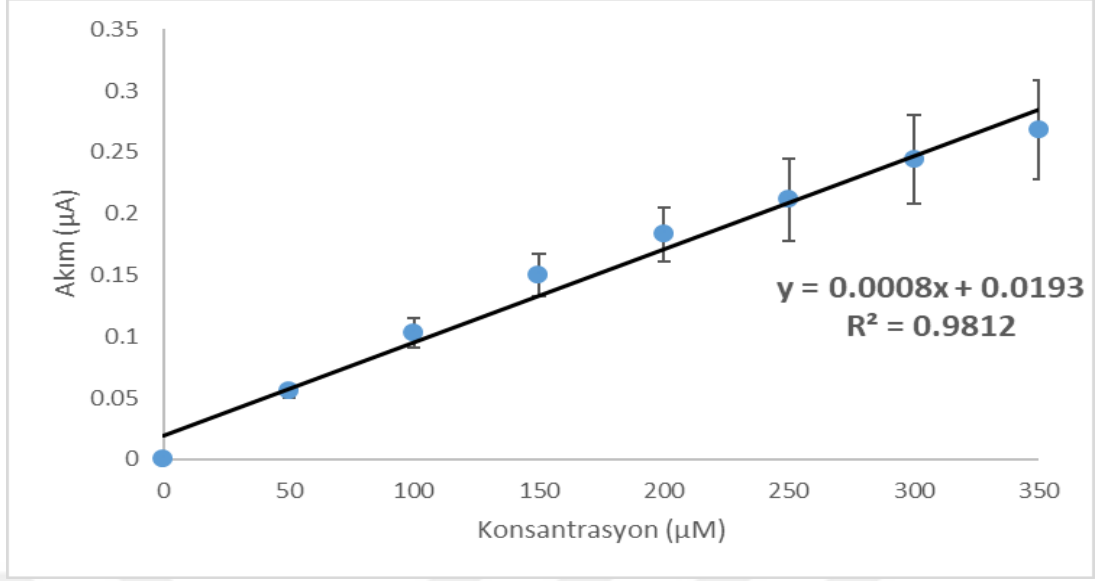
Hazırlanan biyosensörlerin laktik asite karşı aktiviteleri ve performansları kronoamperometri (CA) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde PBS tampon içerisine belirli zaman aralıklarında laktik asit eklenmiş, akımda meydana gelen değişim belirlenerek kaydedilmiştir. Elektrokimyasal performans deneylerinde sistemin voltajı potansiyostat yardımıyla 0,6 V'ta sabitlenmiştir. Bu voltaj değerinin kullanılmasının nedeni Şekil 4.3A' da görüldüğü gibi pik oluşumunun bu değer civarında olmasıdır. Ayrıca, Şekil 4.2'den anlaşıldığı üzere Pt yüzeyinde hidrojen peroksidin oksitlenme potansiyeli de 0,6 V olarak belirlenmiştir. Şekil 4.4' te görüldüğü gibi akım-zaman grafiğinde gürültü akımı sıfırlanmış ve sistemde laktik asit bulunmuyorken akım değerinin sıfır olması sağlanmıştır. PBS çözeltisine 0.05 mM laktik asit eklendiğinde ölçülen akımın hızlı bir şekilde arttığı ve kısa zaman içerisinde de sabitlendiği gözlemlenmiştir. Belirli aralıklarla laktik asit ekleme işlemi tekrarlanmıştır. Her ekleme sonrasında akım hızlı şekilde artmış ve sonra sabitlenmiştir. Bu sonuç istenilen sensör

performansının elde edildiğini, hazırlanan laktik asit biyosensörlerinin sağlıklı ve verimli bir şekilde laktik asit tayini yapabilecek kapasitede olduğunu göstermektedir. Laktik asit eklenmesi ile birlikte hızlı bir şekilde (kısa bir zaman diliminde) akımın artması hazırlanan sensörlerin hızlı sonuç verdiği de göstergesidir. Buna göre elde edilen sensör, biyosensörlerin önemli bir avantajı olan hızlı tayin özelliğini sağlamaktadır (Mehrvar ve ark. 2000, Kissinger 2005, Aykut ve Temiz 2006, Thakur ve Ragavan 2013).



**Şekil 4.4.** Düzenli aralıklarla 50 µM laktik asit eklenmesi sonucu akımda meydana gelen değişim

Şekil 4.4'teki verilerden yararlanarak aynı sensörün belirlenen koşullarda 3 defa bağımsız şekilde tekrarlanmasıyla elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** Akım-zaman grafikleri sonucu elde edilen kalibrasyon eğrisi (n=3)

Şekil 4.5'ten çıkarılacak en önemli sonuçlardan bir tanesi hazırlanan sensörlerin 350 µM laktik asit konsantrasyonuna kadar sağlıklı bir şekilde kullanılabilceğidir. Yapılan deneylerde sensör performanslarının 350 µM konsantrasyonuna kadar doğrusal bir artış gösterdiği, ancak bu değerden sonra akımdaki artışın konsantrasyona göre doğrusal olmayıp doyuma ulaşma eğilimi gösterdiği bulunmuştur. Yani, sensörlerin doğrusal çalışma aralığındaki üst limiti 350 µM olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisinin eğimi, sensörlerin duyarlılıklarını vermektedir. Şekil 4.5'te verilen denklem göz önüne alındığında sensörlerin ortalama duyarlılıkları 0,0008 µA/µM olarak bulunmuştur. Ancak literatürde yer alan diğer çalışmalar ile sağlıklı bir karşılaştırma yapılması için elde edilen bu duyarlılık değerinin yüzey alanı ile normalize etmek gerekmektedir. Buna göre, çalışma kapsamında kullanılan Pt elektrodun çapının 1,6 mm olduğu bilindiğine göre elde edilen duyarlılık değeri 0,04 µA/µM.cm<sup>2</sup>' dir. Geliştirilen elektrokimyasal laktik asit biyosensörünün en düşük tayin limiti LOD = (s/S)\*3 denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Burada S: duyarlılık, s ise gürültü standart sapmasını ifade etmektedir. Bu denklem kullanıldığında sensörlerin tayin limitinin (LOD) 31 µM olduğu bulunmuştur. Tüm bu veriler ışığında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; hazırlanan sensörlerin doğrusal çalışma aralığının 31-350 µM olduğu bulunmuştur. Bulunan bu tayin aralığı, literatürdeki diğer çalışmalarla kıyaslandığında çoğunlukla avantajlı görünmektedir.

Weber ve arkadaşlarının (2006) yapmış olduğu çalışmada; karbon nano tüp laktat oksidaz camısı karbon elektrotları kullanılarak hazırlanan ve damlatma yöntemine göre yani tezdeline oldukça benzer şekilde geliştirilen laktat tayinine yönelik amperometrik laktat biyosensörlerinin tayin aralığı 10000–50000  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (Weber ve ark. 2006). Tez kapsamında yapılan çalışmada tayin aralığının bu aralıktan çok daha düşük olması, düşük miktarlardaki laktatın da tespit edilebileceğini göstermiş olup Weber ve arkadaşlarının çalışmasına bu noktada avantaj oluşturmaktadır.

Parra ve arkadaşlarının (2006), şarap ve biralarda laktat miktarını belirlemeye yönelik geliştirmiş oldukları LOD enzimi kullandıkları elektrokimyasal biyosensörün tayin limiti duyarlılığının daha yüksek olmasına karşın ( $0.77 \pm 0.08 \mu\text{A} \text{mM}^{-1}$ ), çalışma kapsamında geliştirilen sensörün değerine oldukça yakın ( $300 \mu\text{M}$ ) bulunmuştur. Hipoionik asit ya da altın kullanarak enzim immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve oksidasyonu arttırmak için ortama  $0.5 \text{ mM}$  hidroksimetil ferrosen eklemişlerdir (Parra ve ark. 2006). Bu nedenle duyarlılık değerinin daha yüksek çıkmış olabileceği düşünülebilir. Ancak kataltık yüzey kullanılmasına karşın; tayin limitinin yapılan tez çalışmasına yakın olması yine tez çalışmasının daha kolay ve ekonomik olarak üretilebilirlik açısından avantajını göstermektedir.

Dagar ve Pundir (2017), LOD'un karboksilatlı çok katlı karbon nanotüp / bakır nanopartikül / polianilin modifiye kalem grafit elektroda immobilize edildiği amperometrik L-laktat biyosensörü geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu biyosensörün  $1 \mu\text{M}$ – $2500 \mu\text{M}$  gibi oldukça geniş tayin aralığına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bunun nedeni; kullanılan kalem grafit elektrodun oldukça geniş yüzey alanı olmasına bağlamışlardır (Dagar ve Pundir 2017).

Kullanılan elektrot yüzeyine ya da elektrot yüzeyine nanomateryal membran veya ara yüzey uygulanmasına göre biyosensörlerin tayin aralığı değişiklik göstermektedir (Kumar ve ark. 2009, Qiu-li 2009, Lata ve ark. 2012, Dagar ve Pundir 2017). Tüm bilgiler doğrultusunda, tez çalışmasında ara yüzey kullanılmadan tasarlanan ve yüzey kontrollü

olan sensörün laktat tayininde kullanılmaya yönelik uygun tayin aralığına sahip bir biyosensör olduğu çıkarımı yapılabilir.

#### 4.5 Geliştirilen Biyosensör ile İzole Edilen LAB Tarafından Üretilen Laktat Miktarının Tayini

Optimum çalışma koşulları ve tayin aralığı belirlenerek geliştirilen amperometrik laktat biyosensörü ile bakteri izolatlarından elde edilen metabolitlerdeki laktat miktarı 3 tekerrürlü olacak şekilde 0.6 V'ta oda sıcaklığında kronamperometrik olarak ölçülerek sonuçlar aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart sapma olarak Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** İzole edilen LAB'nden elde edilen laktat miktarının geliştirilen biyosensör ile belirlenmesi

İzolat No	Laktik Asit Miktarı (mM)
M17 Besiyeri (Bakteri inoküle edilmemiş)	0,61 $\pm$ 0,01
11	0,28 $\pm$ 0,05
12	0,27 $\pm$ 0,03
13	0,25 $\pm$ 0,06
14	0,33 $\pm$ 0,03
21	1,30 $\pm$ 0,13
23	1,25 $\pm$ 0,03
24	1,06 $\pm$ 0,22
31	1,09 $\pm$ 0,07
32	1,18 $\pm$ 0,18
33	9,87 $\pm$ 0,75
41	5,91 $\pm$ 0,71
421	0,80 $\pm$ 0,08
4221	4,20 $\pm$ 0,35
4222	2,67 $\pm$ 1,82
431	2,49 $\pm$ 0,26
432	2,20 $\pm$ 0,04
51	7,92 $\pm$ 0,94
62	6,98 $\pm$ 0,56
631	3,08 $\pm$ 0,34
632	3,17 $\pm$ 0,09
71	6,48 $\pm$ 0,77
72	5,94 $\pm$ 0,21
73	4,62 $\pm$ 0,45



#### 4.6 HPLC ile İzole Edilen LAB Tarafından Üretilen Laktat Miktarının Tayini

Bakteri izolatlarından elde edilen metabolitlerdeki laktat miktarı HPLC ile 3 tekerrürlü olacak şekilde ölçülerek, sonuçlar ortalama olarak Çizelge 4.3'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, biyosensör tayini ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.3.** İzole edilen LAB'nden elde edilen laktat miktarının HPLC ile belirlenmesi

İzolat No	Laktik Asit Miktarı (mM)
11	1,77
12	2,16
13	4,08
14	1,84
21	4,47
23	4,43
24	2,86
31	2,80
32	3,15
33	3,59
41	-
421	-
4221	5,39
4222	3,40
431	0,13
432	-
51	2,61
62	2,46
631	1,84
632	-
71	5,52
72	3,81
73	1,36

Gerçek örneklerde yapılan HPLC ve biyosensör ölçüm sonuçları incelendiğinde; biyosensörün 71,421, 4222 ve 4221 numaralı örneklerde HPLC metodu ile hemen hemen benzer sonuçları bulmasına karşın; pek çok örnekte çok daha yüksek oranlarda laktat

miktarı belirlediği görülmektedir. Bunun nedeni; biyosensörün HPLC'den daha hassas olmasından dolayı laktat benzeri bileşenleri de ölçmesi olarak düşünülebilir. Bu da; biyosensörde HPLC'de olduğu gibi şahite karşı ölçüm yapılamadığı için yani çevresel etkenler ortadan kaldırılamadığı için HPLC metodunda tayin edilemeyen laktat miktarları biyosensörde belirlenmesinden; ya da metabolit içerisinde bulunan ikincil metabolitlerin de elektrot yüzeyinde oksitlenerek ölçüm sonucunu etkilemesinden (parazit madde) kaynaklanabilmektedir. Ayrıca biyosensörün tekrarlanabilirliğinin HPLC'den daha düşük olması da sonuçların metotlara göre farklılık göstermesine neden olabilmektedir. Bu tip sorunlar, genel olarak gerçek örnekler ile yapılan ölçümlerde gözlenmektedir (Parra ve ark. 2006, Romero ve ark. 2008, Canbay ve ark. 2015, Omanovic-miklicanin ve Valzacchi 2017, Cunha-silva ve Arcos-martinez 2018). Ancak yine de süre açısından değerlendirildiğinde; biyosensör ölçümünün HPLC analizine göre çok daha hızlı olduğu görülmüştür. Biyosensörle her bir örnek yaklaşık 3 dk'da ölçülürken; HPLC ile 20 dk'da ölçülmektedir. Buna ek olarak HPLC analizinin, biyosensör ölçümüne göre uzun süren ön hazırlığı da göz önünde bulundurulduğunda; aynı sayıdaki numune biyosensör ile yarım günde analiz edilirken, HPLC ile bu işlem gün aşırı sürmektedir. Aşağıda örnek olarak verilen bazı çalışmalarda; biyosensörlerin yaygın kullanılan yöntemlere göre daha kısa sürede yanıt vermesi ve bu yöntemlerle sonuçlarının kıyaslanması yapılan çalışma da göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

Kriz ve arkadaşlarının (2002), bebek mamaları ve domates pürelerinde bulunan laktat miktarını, geliştirdikleri amperometrik mikroenzim biyosensör ve spektrofotometrik tayin metoduyla belirlemeye çalışmışlardır. Spektrofotometrik tayin ve biyosensör ölçüm sonuçları arasında paralellik bulmuşlardır. Hatta biyosensörün sonuçları spektrofotometrik değerlerden, tıpkı tez çalışmasındaki pek çok sonuçta olduğu gibi, domates pürelerinde %12 ve bebek mamalarında %2.5 daha yüksek değerler göstermiştir. Aynı zamanda biyosensör ölçümünün 3 dk'da, spektrofotometrik ölçümün ise 35 dk'da tamamlandığını belirterek biyosensörlerle yapılan ölçümlerin süre olarak avantajını da bu tez çalışması ve birçok çalışmada olduğu gibi göstermişlerdir (Kriz ve ark. 2002).

Omanovic-miklicanin ve Valzacchi (2017)'nin yapmış olduğu çalışmada; biyojen amin tayinine yönelik kemilüminesans biyosensör geliştirilerek; etlerde bulunan biyojen amini

belirlemek amacıyla gerçek örneklerde denenmiş ve sonuçlar HPLC analiz sonuçları ile kıyaslanmıştır. Et örneklerinde iki metod ile gerçekleştirilen ölçüm sonuçları arasında çok büyük farklılıklar olmamakla birlikte; tıpkı yapılan çalışmada olduğu gibi biyosensör ölçüm sonuçları daha yüksek çıkmıştır. Bunu; biyojen amin miktarını etkileyebilecek ette bulunan diğer aminlerin varlığı ile ve yine buna da biyosensörün HPLC'ye göre düşük tekrarlanabilirliğinin neden olması ile açıklamışlardır (Omanovic-miklicanin ve Valzacchi 2017).

Šturdík ve arkadaşları (2013), şıra fermentasyonu esnasında monosakaritlerin, oligosakaritlerin, etanol ve gliserolün izlenebilirliği için enzim temelli amperometrik biyosensör ile ölçüm, HPLC ve spektrofotometri metodlarını kıyaslamışlardır. Çalışmanın sonucunda da; maltoz veya maltotriozun spesifik olarak izlenmesi için sadece HPLC yönteminin uygun olduğunu, fermentasyonun sonraki aşamalarında hem glukoz hem de fruktoz tespiti için biyosensörler ve spektrofotometrinin; etanol ve gliserol analizleri için üç metodunda uygun olduğunu belirtmişlerdir. Sonuçlarda çok büyük farklılık olmamasından dolayı; biyosensörün alternatif ölçüm metodu olarak kullanılabilmesi için tayinlerde ekonomik ve çok daha hızlı olması nedeniyle tercih edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir (Šturdík ve ark. 2013).

Canbay ve arkadaşları (2015), yapmış oldukları çalışmada laktik asit ve pirüvik asiti belirleyen mikrobiyal biyosensör (0,1-10 mM tayin aralığına sahip) geliştirmişlerdir. Gerçek örnek denemelerini, kit (Sigma Aldrich Assay Kit) ile kontrol etmişler ve kefir, süt ve tereyağı örneklerinde L-laktat miktarını belirlemişlerdir. İki metod sonuçları yakın olmakla beraber; tıpkı tez çalışmasındaki sonuçlar gibi bazı biyosensör ölçüm sonuçları kitin ölçüm sonuçlarından yüksek çıkarken; bazıları düşük çıkmıştır. Bu durumun parazit oluşturan bir maddeden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Canbay ve ark. 2015).

## 5. SONUÇ

Laktat seviyesi, tarım ve gıda proseslerinde sürdürülebilirliğin bir gereği olarak gıda güvenliği kapsamında, raf ömrünün belirlenmesinde, stabilite ve kalite kontrolünde önemli bir parametredir. Ayrıca, yorgunluğun, hasta sağlığının izlenmesinde, septik şok ve organ yetmezliği gibi riskli durumların önceden belirlenmesinde oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle, laktat tayinin izlenmesi, özellikle gıda ve sağlık endüstrileri için oldukça gereklidir. Bu noktada; uzun zaman alan, deneyimli çalışan gerektiren ve yorucu olan yaygın kullanılan yöntemler yerine; hızlı, güvenilir, hassas, kolay kullanılabilir ve ekonomik cihazlar olmaları nedeniyle laktat tayininde biyosensör kullanımı doğru bir seçim olacaktır.

Laktat tayinine yönelik geliştirilen biyosensörlerin çoğu laboratuvar ölçekli olmakla birlikte ticari amaçla yaygın olarak kullanılanları da bulunmaktadır. Tasarlanan biyosensörlerin çoğu amperometrik transduserli enzim temelli biyosensörler olmakla birlikte LOD enziminin oksitlenme reaksiyonuna dayanmaktadır. LOD enziminin LDH enzimine göre daha fazla tercih edilme nedeni; LDH enziminin çalışma prensibinde daha karmaşık bir reaksiyon sisteminin (LDH ve NADH oksidaz enzimlerini içeren iki enzimli bir sistem) bulunmasıdır. Yapılan çalışmada da laktik asitin, LOD enzimi tarafından oksitlenmesi ile oluşan hidrojen peroksidin elektrot yüzeyine ulaştığında verdiği reaksiyon sonucu açığa çıkan elektronun gösterdiği akım değişiminden laktik asit miktarının tespit edildiği camsı karbon elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve karşıt platin elektrottan oluşan 3 lü elektrot sistemine sahip enzim temelli amperometrik laktat biyosensörü geliştirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda doğrusal çalışma aralığı 31-350  $\mu\text{M}$  ve duyarlılığı 0.0008  $\mu\text{A}/\mu\text{M}$  olan laktat biyosensörü geliştirilmiştir. Buna ek olarak; laktatın doğada laktik asit bakterileri tarafından üretildiği bilindiği için geliştirilen biyosensör, farklı fermente gıdalardan izole edilen LAB'nin ürettikleri laktat miktarının tayini için kullanılmıştır. Sonuçlar, yaygın olarak kullanılan bir tayin metodu olan HPLC analizinin aynı metabolitler için elde edilen verileri ile kıyaslanmıştır. Bunun sonucunda; bazı örnekler için verilerde tutarlılık olduğu gözlenirse de, diğer sonuçlar arasında farklılıklar bulunmuş olup pek çok numunede biyosensör sonuçları daha yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni ise; izole edilen LAB'nin heterofermentatif olması durumunda oluşan sekonder metabolitlerin de ölçülmesi ya da ortama farklı kaynaklardan dahil olan

laktik asitin de bakteri metaboliti ile birlikte ölçülmesi olabilir. Bu sorunun ortadan kaldırılması için nanopartikül ya da başka bir arayüzey materyali ile elektrot yüzeyi kaplanarak parazitler elimine edilebilir. Bunlar dışında, iki metotla yapılan çalışmalarda biyosensörün; her bir örnek için 3 dk'dan daha kısa sürede ölçüm yapması ve uzun ön hazırlık gerektirmemesi sebebiyle her bir numunenin 20 dk'da ölçüldüğü ve uzun hazırlıklar gerektiren HPLC metoduna göre çok daha hızlı olduğu yapılan çalışmayla belirlenmiştir.

Sonuç olarak; hızlı, taşınabilir, eğitimli çalışan gerektirmeyen ve ekonomik cihazlar olan biyosensörler; günümüzde çok fazla numuneyle çalışılması açısından hem endüstride hem de akademik çalışmalarda kullanılmak üzere gerekli olan cihazlardır. Ayrıca, Dünya çapında biyosensörlere yönelik artan ilgi sonucunda bu endüstri hızla gelişme göstererek akademik olarak yerinde tanı yapabilen, giyilebilir sensörlere kadar yenilikçi bir alan yaratmakta ve de ekonomik olarak ülkelerin pazar paylarına değer katmaktadır. Bu sebeple ülkelerin kendi biyosensör pazarlarını oluşturmaları önemlidir. Ancak ne yazık ki, ülkemizde birkaç laboratuvar ölçekli çalışma dışında yerli üretim ticari biyosensör bulunmamaktadır. Bu nedenle, yakın gelecekte yerli üretim olarak piyasaya sunulacak biyosensörlerin üretimine yönelmek önem kazanmaktadır. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen bulgular, ticari çalışmalara katkıda bulunulacağı sonucunu doğurmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Aksoy, S., Tunturk, H., Hasirci, N. 1998.** Stability of alfa-amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *Journal of Biotechnology*, 60(1–2):, 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00179-X)
- Alocilja, E. C., Radke, S. M. 2003.** Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5–6):, 841–846. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00009-5)
- Altuntaş, E. G., Ayhan, K., Okcu, G., Erkanlı, K., Balcı, M. H., Sonakın, Ş. S. 2010.** Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktiviteleri. *GIDA*, 35(3):, 197–203.
- Anzai, J. I., Takeshita, H., Kobayashi, Y., Osa, T., Hoshi, T. 1998.** Layer-by-layer construction of enzyme multilayers on an electrode for the preparation of glucose and lactate sensors: elimination of ascorbate interference by means of an ascorbate oxidase multilayer. *Analytical Chemistry*, 70(4):, 811–817. <https://doi.org/10.1021/ac970536b>
- Avcı, M. B. 2007.** Trakya bölgesinde buğday, arpa, mısır ve çeltik tarımında herbisit kullanımının sürdürülebilir tarım açısından değerlendirilmesi. *Doktora Tezi*, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Edirne.
- Avramescu, A., Noguer, T., Avramescu, M., Marty, J. L. 2002.** Screen-printed biosensors for the control of wine quality based on lactate and acetaldehyde determination. *Analytica Chimica Acta*, 458(1):, 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01580-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01580-X)
- Aykut, U., Temiz, H. 2006.** Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(3):, 51–59.
- Babacan, S., Pivarnik, P., Letcher, S., Rand, A. G. 2000.** Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(11–12):, 615–621. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00115-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00115-9)
- Bahadır, E. B., Sezgintürk, M. K. 2015.** Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry*, 478:, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.011>
- Bakker, J., Gris, P., Coffernils, M., Kahn, R. J., Vincent, J. L. 1996.** Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic

shock. *American Journal of Surgery*, 171(2):, 221–226. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(97\)89552-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(97)89552-9)

**Ballerstadt, R., Gowda, A. 2004.** Military Metabolic Monitoring. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 6(3):, 191–201.

**Ballesta-Claver, J., Valencia-Mirón, M. C., Capitán-Vallvey, L. F. 2008.** One-shot lactate chemiluminescent biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 629(1–2):, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.09.028>

**Borisov, S. M., Wolfbeis, O. S. 2008.** Optical biosensors. *Chem. Rev.*, 108(2):, 423–461. <https://doi.org/10.1016/B978-044453125-4.50017-6>

**Brena, B. M., Batista-Viera, F. 2013.** Immobilization of enzymes: A literature survey. *Methods in Biotechnology : Methods in Biotechnology*, Ed.: J. M. Guisan (Ed.), Humana Press Inc., 15–31. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2)

**Canbay, E., Habip, A., Kara, G., Eren, Z., Akyilmaz, E. 2015.** A microbial biosensor based on *Lactobacillus delbrueckii* sp . bacterial cells for simultaneous determination of lactic and pyruvic acid. *Food Chemistry*, 169:197–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.140>

**Canh, T. M. 1993.** Biosensors (K. T. V Grattan & A. Augousti, Eds.), London, : Chapman & Hall.

**Carvalho, F. P. 2006.** Agriculture , pesticides , food security and food safety. *Environmental Science & Policy*, 9:, 685–692. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2006.08.002>

**Casero, E., Alonso, C., Petit-Domínguez, M. D., Vázquez, L., Parra-Alfambra, A. M., Merino, P., Álvarez-García, S., Andrés, A., Suárez, E., Pariente, F., Lorenzo, E. 2014.** Lactate biosensor based on a bionanocomposite composed of titanium oxide nanoparticles, photocatalytically reduced graphene, and lactate oxidase. *Microchimica Acta*, 181(1–2):, 79–87. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1070-z>

**Cebeci, Z. 2006.** Gıda İzlenebilirliğinde Bilgi Teknolojileri. Ulusal Tarım Kurultayı : Ulusal Tarım Kurultayı, Adana, 15–17.

**Chaplin, M. F. (Martin F. ., Bucke, C. 1990.** Enzyme Technology, Cambridge University Press. <http://www.e-booksdirectory.com/details.php?ebook=1870> (Erişim tarihi: 18.11.2017).

**Choi, M. M. F. 2004.** Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers.

*Microchimica Acta*, 148(3–4):, 107–132. <https://doi.org/10.1007/s00604-004-0273-8>

**Clark, L. C., Lyons, C. 1962.** Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Annals New York Academy of Sciences*, 29–45. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x/epdf>

**Cunha-silva, H., Arcos-martinez, M. J. 2018.** Talanta dual range lactate oxidase-based screen printed amperometric biosensor for analysis of lactate in diversi fi ed samples. *Talanta*, 188(March):, 779–787. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.054>

**Çelik, A. C. 2014.** Laktat tayini için laktat oksidaz temelli amperometrik enzim elektrot hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi*, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Tekirdağ.

**Dagar, K., Pundir, C. S. 2017.** enzyme and microbial technology an improved amperometric L-lactate biosensor based on covalent immobilization of microbial lactate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes / copper nanoparticles / polyaniline modified pencil graphite electro. *Enzyme and Microbial Technology*, 96:, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.10.014>

**Datta, S., Christena, L. R., Rajaram, Y. R. S. 2013.** Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>

**Divies, C. 1975.** Remarks on ethanol oxidation by an “*Acetobacter xylinum*” microbial electrode. *Ann Microbiol*, 175–186.

**Dungchai, W., Chailapakul, O., Henry, C. S. 2009.** Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Anal. Chem.*, 81(14):, 5821–5826.

**Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., Yuze, S. 2008.** Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Analytica Chimica Acta*, 620(1–2):, 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.022>

**Faridnia, M. H., Palleschi, G., Lubrano, G. J., Guilbault, G. G. 1993.** Amperometric biosensor for determination of lactate in sweat. *Analytica Chimica Acta*, 278(1):, 35–40. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80082-V](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)80082-V)

**Faude, O. ve ark. 2009.** Lactate threshold concepts: How valid are they?. *Sports Medicine*, 39(6):, 469–490. <https://doi.org/10.2165/00007256-200939060-00003>

**Gerhardt, P. 1981.** Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology. USA, 524 pp.



- Girotti, S., Muratori, M., Fini, F., Ferri, E. N., Carrea, G., Koran, M., Rauch, P. 2000.** Luminescent enzymatic flow sensor for D-and L-lactate assay in beer. *Eur Food Res Technol*, 210: 216–219.
- Gökirmaklı, Ç., Bayram, M. 2018.** Gıda için gelecek öngörürleri : yıl 2050. *Akademik Gıda*, 16(3): 351–360. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.475396>
- Göpel, W., Heiduschka, P. 1995.** Interface analysis in biosensor design. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(9–10):, 853–883. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)99225-A](https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)99225-A)
- Guilbault, G. G., Montalvo, J. G. 1970.** Enzyme electrode for the substrate urea. *Journal of the American Chemical Society*, 92(8): 2533–2538. <https://doi.org/10.1021/ja00711a052>
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., Ozkan, S. A. 2013.** UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, 76(21–22):, 1365–1427. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2477-8>
- Hammond, J. L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S., Tkac, J. 2016.** Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(June): 69–80. <https://doi.org/10.1042/EBC20150008>
- Harrigan, W. F., McCance, M. E. 1976.** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London, 452 pp. Retrieved from <https://lib.ugent.be/en/catalog/rug01:000086624>
- Horrigan, L., Lawrence, R. S., Walker, P. 2002.** Review how sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental Health Perspectives*, 110(5): 445–456.
- House, J. L., Anderson, E. M., Ward, W. K. 2007.** Immobilization techniques to avoid enzyme loss from oxidase-based biosensors: a one-year study. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 1(1):, 18–27. <https://doi.org/10.1177/193229680700100104>
- Hu, Y., Wilson, G. S. 2002.** Rapid changes in local extracellular rat brain glucose observed with an in vivo glucose sensor. *Journal of Neurochemistry*, 68(4):, 1745–1752. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68041745.x>
- Ibupoto, Z. H., Shah, S. M. U. A., Khun, K., Willander, M. 2012.** Electrochemical L-Lactic acid sensor based on immobilized ZnO nanorods with lactate oxidase. *Sensors*, 12(12): 2456–2466. <https://doi.org/10.3390/s120302456>
- ICH Official web site : ICH.** <https://www.ich.org/> (Erişim tarihi: 09.12.2018).

- Ispas, C. R., Crivat, G., Andreescu, S. 2012.** Review: recent developments in enzyme-based biosensors for biomedical analysis. *Analytical Letters*, 45(2–3): 168–186. <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.633188>
- Jia, W., Bandodkar, A. J., Valdés-Ramírez, G., Windmiller, J. R., Yang, Z., Ramírez, J., Chan, G., Wang, J. 2013.** Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration. *Analytical Chemistry*, 85(14): 6553–6560. <https://doi.org/10.1021/ac401573r>
- Junhui, Z., Hong, C., Ruifu, Y. 1997.** DNA based biosensors. *Biotechnology Advances*, 15(1): 43–58. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(97\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(97)00003-7)
- Katrlík, J., Pizzariello, A., Mastihuba, V., Svorc, J., Stred'ansky, M., Miertus, S. 1999.** Biosensors for L-malate and L-lactate based on solid binding matrix. *Analytica Chimica Acta*, 379(1–2): 193–200. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00610-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00610-2)
- Kissinger, P. T. 2005.** Biosensors - a perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12): 2512–2516. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.004>
- Koncki, R. 2007.** Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 599: 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.003>
- König, H. ve ark. 2017.** Lactic acid bacteria. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, Chapter 1, 1-41. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5>
- Kriz, K., Kraft, L., Krook, M., Kriz, D. 2002.** Amperometric determination of L-lactate based on entrapment of lactate oxidase on a transducer surface with a semi-permeable membrane using a SIRE technology based biosensor. application: tomato paste and baby food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): 3419–3424. <https://doi.org/10.1021/jf0114942>
- Kulkarni, A. S., Joshi, D. C., Tagalpallewar, G. P. 2014.** Biosensors for food and dairy industry. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 33(4): 292. <https://doi.org/10.5958/0976-0563.2014.00619.8>
- Kumar, A., Vatsyayan, P., Goswami, P., Minter, S. D. 2009.** Biosensors and bioelectronics recent advances in material science for developing enzyme electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 2313–2322. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.09.026>
- Lata, S., Batra, B., Karwasra, N., Pundir, C. S. 2012.** An amperometric H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor based on cytochrome c immobilized onto nickel oxide nanoparticles / carboxylated

multiwalled carbon nanotubes / polyaniline modified gold electrode. *Process Biochemistry*, 47(6): 992–998. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.03.018>

**LC, Q. J. 1956.** Monitor and control of blood and tissue oxygen. *ASAIO Journal*, 41-48.

**Leonard, P., Quinn, J., O'Kennedy, R. 2003.** Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1): 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00232-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00232-6)

**Li, Y. S., Ju, X., Gao, X. F., Zhao, Y. Y., Wu, Y. F. 2008.** Immobilization enzyme fluorescence capillary analysis for determination of lactic acid. *Analytica Chimica Acta*, 610(2): 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.049>

**Liedberg, B., Nylander, C., Lunström, I. 1983.** Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensor Actuator*, 4: 299–304. [https://doi.org/10.1016/0250-6874\(83\)85036-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7)

**Liu, Y., Matharu, Z., Howland, M. C., Revzin, A., Simonian, A. L. 2012.** Affinity and enzyme-based biosensors: Recent advances and emerging applications in cell analysis and point-of-care testing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(4): 1181–1196. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6149-6>

**Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., Tunon-Blanco, P. 1997.** A bienzyme-poly-(o-phenylenediamine)-modified carbon paste electrode for the amperometric detection of -lactate. *Analytica Chimica Acta*, 346(2): 165–174. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(97\)00115-3](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(97)00115-3)

**Luong, J. H. T., Bouvrette, P., Male, K. B. 1997.** Developments and applications of biosensors in food analysis. *Trends in Biotechnology*, 15(9): 369–377. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01071-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01071-8)

**Luong, J. H. T., Male, K. B, Glennon, J. D. 2008.** Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnology Advances*, 26(5): 492–500. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.007>

**Malhotra, B. D., Chaubey, A. 2003.** Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 91(1–3): 117–127. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00075-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00075-3)

**Marcosy, M.-P., Barcelo, D. 1996.** Environmental applications of analytical biosensors. *Measurement Science and Technology*, 7: 1547–1562. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/7/11/002>

**Market Research Report Collections, 2014.** www.strategyr.com (Erişim Tarihi: 15.01.2017).

**Marrazza, G. 2014.** Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: a review. *Biosensors*, 4(3): 301–317. <https://doi.org/10.3390/bios4030301>

**Mazzei, F., Azzoni, A., Cavalieri, B., Botre, F., Botre, C. 1996.** A multi-enzyme bioelectrode for the rapid determination of total lactate concentration in tomatoes, tomato juice and tomato paste. *Food Chemistry*, 55(4): 413–418. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00168-9)

**Meena, A., Rajendran, L. 2010.** Mathematical modeling of amperometric and potentiometric biosensors and system of non-linear equations – homotopy perturbation approach. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 644(1): 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.03.027>

**Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M., Luong, J. H. 2000.** Fiber-Optic Biosensors-Trends and Advances. *Analytical Sciences*, 16(7): 677–692. <https://doi.org/10.2116/analsci.16.677>

**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(2): 237–256. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00104-8)

**Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., Wahab, R. A. 2015.** An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(2): 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

**Monosik, R., Stredansky, M., Tkac, J., Sturdik, E. 2012.** Application of enzyme biosensors in analysis of food and beverages. *Food Analytical Methods*, 5(1): 40–53. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9222-4>

**Monošík, R. Stredansky, M., Greif, G., Sturdik, E. 2012.** A rapid method for determination of l-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite. *Food Control*, 23(1): 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.021>

**Mosbach, K., Danielsson, B. 1974.** An enzyme thermistor. *BBA - Enzymology*, 364(1): 140–145. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(74\)90141-7](https://doi.org/10.1016/0005-2744(74)90141-7)

**Moser, I., Jobst, G., Urban, G. A. 2002.** Biosensor arrays for simultaneous measurement

of glucose, lactate, glutamate, and glutamine. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(4): 297–302. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00298-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00298-6)

**Murugaboopathi, G., Velusamy, P., Chinnachamy, C., Vinurajkumar, S. 2013.** Applications of biosensors in food industry. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10(2): 711–714. <https://doi.org/10.13005/bbra/1185>

**Nikolaus, N., Strehlitz, B. 2008.** Amperometric lactate biosensors and their application in (sports) medicine, for life quality and wellbeing. *Microchimica Acta*, 160(1–2): 15–55. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0834-8>

**Omanovic-miklicanin, E., Valzacchi, S. 2017.** Development of new chemiluminescence biosensors for determination of biogenic amines in meat. *Food Chemistry*, 235(14412007): 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.031>

**Opara, L. U. 2003.** Traceability in agriculture and food supply chain : a review of basic concepts , technological implications , and future prospects. *Food, Agriculture & Environment*, 1(1): 101–106.

**Özoğlu, Ö., Ünal, M. A., Güneş-Altuntaş, E. 2017.** Biyosensörler : gıda ve sağlık alanında laktat biyosensörleri. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*, 2(2): 180–193.

**Palleschi, G., Mascini, M., Bernardi, L., Zeppilli, P. 1990.** Lactate and glucose electrochemical biosensors for the evaluation of the aerobic and anaerobic threshold in runners. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 28: 25–28.

**Pancrazio, J. J., Whelan, J. P., Borkholder, D. A., Ma, W., Stenger, D. A. 1999.** Development and application of cell-based biosensors. *Annals of Biomedical Engineering*, 27(6): 697–711. <https://doi.org/10.1114/1.225>

**Parra, A., Casero, E., Vázquez, L., Pariente, F., Lorenzo, E. 2006.** Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces. *Analytica Chimica Acta*, 555(2): 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.025>

**Pérez, S., Sanchez, S., Fabregas, E. 2012.** Enzymatic strategies to construct L-Lactate biosensors based on polysulfone/carbon nanotubes membranes. *Electroanalysis*, 24(4): 967–974. <https://doi.org/10.1002/elan.201100628>

**Prodromidis, M. I., Karayannis, M. I. 2002.** Enzyme based amperometric biosensors for food analysis. *Electroanalysis*, 14(4): 241–261. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200202\)14:4<241::AID-ELAN241>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200202)14:4<241::AID-ELAN241>3.0.CO;2-P)

- Przybyt, M. 2014.** Lactate biosensors for food industry. *Biotechnology and Food Sciences*, 78(1): 71–88.
- Qiu-li, Z. 2009.** Preparation of copper nanoparticles by chemical reduction method using potassium borohydride. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, 20(2010): 240–244.
- Raba, J., Fernández-Baldo, M. A., Pereira, S. V., Messina, G. A., Bertolino, F. A., Tosetti, S., Ferramola, M. I. S. 2013.** Analytical biosensors for the pathogenic microorganisms determination. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 227–238.
- Rahman, M. M., Shiddiky, M. J. A., Rahman, M. A., Shim, Y. B. 2009.** A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film. *Analytical Biochemistry*, 384(1): 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.09.030>
- Ramanathan, K., Danielsson, B. 2001.** Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6): 417–423. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00124-5)
- Rao, V. K., Suresh, S., Sharma, M. K., Gupta, A., Vijayaraghavan, R. 2011.** Carbon nanotubes - a potential material for affinity biosensors. *Intech Open*: 163-188. <https://doi.org/10.5772/16836>
- Rassaei, L. Tsujimura, S., Van den Berg, A. 2013.** Lactate biosensors: current status and outlook. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(1): 123–137. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7307-1>
- Rathee, K., Dhull, V., Dhull, R., Singh, S. 2016.** Biosensors based on electrochemical lactate detection: a comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5: 35–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.010>
- Rawson, F. J., Purcell, W. M., Xu, J., Pemberton, R. M., Fielden, P. R., Biddle, N., Hart, J. P. 2009.** A microband lactate biosensor fabricated using a water-based screen-printed carbon ink. *Talanta*, 77(3): 1149–1154.
- Renneberg, R., Lisdat, F. 2006.** Biosensing for the 21st century. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*: 1-20. <https://doi.org/10.1007/11579328>
- Reshetilov A. N., Iliasov, P. V., Reshetilova, T. A. 2010.** The microbial cell based biosensors. *Intelligent and Biosensors, In Tech*: 289–322.
- Robergs, R. A., Ghiasvand, F., Parker, D. 2004.** Biochemistry of exercise-induced

metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(3): 502–516. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00641.2004>.

**Rogers, K. R. 2000.** Principles of affinity-based biosensors. *Molecular Biotechnology*, 14(2): 109–130. <https://doi.org/10.1385/MB:14:2:109>

**Romero, M. R., . 2008.** Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 131(2): 590–595. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.12.044>

**Romero, M. R. Ahumada, F., Garay, F., Baruzzi, A. M. 2010.** Amperometric biosensor for direct blood lactate detection. *Analytical Chemistry*, 82(13): 5568–5572. <https://doi.org/10.1021/ac1004426>

**Rustagi, S., Pravesh Kumar 2013.** Biosensor and it's application in food industry. *Advances in Bioresearch*, 168–170. Retrieved from <http://soeagra.com/abr/june2013/27.pdf>

**Sanayi Genel Müdürlüğü 2013.** Gıda ve içecek sektörü raporu. T.C. Bilim, Sanayi Ve Teknoloji Bakanlığı, 1-26.

**Scheller, F., Schubert, F. 1992.** Biosensors. Elsevier, Berlin, Germany, 359 pp. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93769-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93769-0)

**Serra, B., Reviejo, A. J., Parrado, C., Pingarrón, J. M. 1999.** Graphite-teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: application to food samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(5): 505–513. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(99\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00022-6)

**Shah, N. C., Lyandres, O., Walsh, J. T., Glucksberg, M. R., Van Duyne, R. P. 2007.** Lactate and sequential lactate–glucose sensing using surface-enhanced raman spectroscopy. , 79(18):, 6927–6932.

**Shram, N. F., Netchiporouk, L. I., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., Bonnet, C., Cespuglio, R. 1998.** In vivo voltammetric detection of rat brain lactate with carbon fiber microelectrodes coated with lactate oxidase. *Analytical Chemistry*, 70(13): 2618–2622. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9666730>

**Singh, M., Verma, N., Garg, A. K., Redhu, N. 2008.** Urea biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 134(1): 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.04.025>

**Smit, N. J., Howatson, G., Greenfield, G. 2010.** Blood lactate levels as a biomarker for angling- induced stress in tigerfish *Hydrocynus vittatus* from the Okavango Delta ,

Botswana. *African Journal of Aquatic Science*, 34(3): 255-259.  
<https://doi.org/10.2989/AJAS.2009.34.3.7.983>

**Šturdík, E., Monosik, R., Magdolen, P., Stredansky, M. 2013.** Monitoring of monosaccharides , oligosaccharides , ethanol and glycerol during wort fermentation by biosensors , HPLC and spectrophotometry. *Food Chemistry*, 138(2013): 220–226.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.039>

**Sun, C., Wng, D., Zhang, M., Ni, Y., Shen, X., Song, Y., Geng, Z., Xu, W., Liu, F., Mao, C. 2015.** Novel l-lactic acid biosensors based on conducting polypyrrole-block copolymer nanoparticles. *The Analyst*, 140(3): 797–802.  
<https://doi.org/10.1039/C4AN01602E>

**Teo, S. C., Wong, L. S. 2014.** Whole cell-based biosensors for environmental heavy metals detection. *Annual Research & Review in Biology*, 4(17): 2663–2674.

**Thakur, M. S., Ragavan, K. V. 2013.** Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4): 625–641. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0783-z>

**Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S. 2001.** Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2): 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)

**Thrupp, L. A. 2000.** Linking agricultural biodiversity and food security: the valuable role of agrobiodiversity for sustainable agriculture. *International Affairs*, 76(2): 265–281.

**Tothill, I. E. 2001.** Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Computers and Electronics in Agriculture*, 30(1–3): 205–218.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1699\(00\)00165-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1699(00)00165-4)

**Towseef, W., Amin, Q, A., Quadir, N. 2013.** Role of biosensors in agro-food technology. *Asian Journal of Home Science*, 8(1): 347–352.

**Tsai, Y. C., Chen, S. Y., Liaw, H. W. 2007.** Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 125(2): 474–481.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.02.052>

**Turhan, Ş. 2005.** Tarımda sürdürülebilirlik ve organik tarım. *Tarım Ekonomisi Dergisi*, 11(1): 13–24.

**Turner, A. P. F. 2015.** Biosensors: fundamentals and applications. . Oxford University Press, Oxford, UK, 770 pp. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.027>



- Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı 2010.** İyi Tarım Uygulamaları Hakkında Yönetmelik. <https://www.tarimorman.gov.tr> (Erişim tarihi: 15.12.2018).
- Uygun, M., Aktaş-Uygun, G., Karagözler, A. A. 2013.** PVA-Aljinat Küreler Üzerine  $\alpha$ -Amilaz Enziminin İmmobilizasyonu. *Tralleis Elektronik Dergisi*, 1(2013):, 45–50.
- Uzunoglu, A., Ramirez, I., Andreasen, E., Stanciu, L. A. 2016a.** Layer by layer construction of ascorbate interference-free amperometric lactate biosensors with lactate oxidase, ascorbate oxidase, and ceria nanoparticles. *Microchimica Acta*, 183(5): 1667–1675. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1796-5>
- Uzunoglu, A., Song, S., Stanciu, L. A. 2016b.** A sensitive electrochemical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor based on PdAg-decorated reduced graphene oxide nanocomposites. *Journal of The Electrochemical Society*, 163(7): B379–B384. <https://doi.org/10.1149/2.1201607jes>
- Uzunoglu, A. 2016.** Nanoparticle-based electrochemical sensors for the detection of lactate and hydrogen peroxide. *Doktora Tezi*, Purdue University, USA.
- Velasco-Garcia, M. N. 2009.** Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(1): 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.013>
- Velasco-Garcia, M. N., Mottram, T. 2003.** Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering*, 84(1): 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1537-5110\(02\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S1537-5110(02)00236-2)
- Viswanathan, S., Radecki, J. 2008.** Nanomaterials in electrochemical biosensors for food analysis - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58(2): 157–164.
- Wang, J. 1999.** Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19(1–2): 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00056-9)
- Wang, J. 2002.** Electrochemical nucleic acid biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 469(1): 63–71. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01399-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01399-X)
- Ward, W. K. ve ark. 2004.** A wire-based dual-analyte sensor for glucose and lactate: in vitro and in vivo evaluation. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 6(3):, 389–401.
- Weber, J., Kumar, A., Kumar, A., Bhansali, S. 2006.** Novel lactate and pH biosensor for skin and sweat analysis based on single walled carbon nanotubes. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 117(1): 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.12.025>
- Wilson, G. S., Hu, Y. B. 2000.** Enzyme based biosensors for in vivo measurements.

*Chem. Rev.*, 100(7): 2693–2704. Retrieved from <Go to ISI>://000088366500011

**Yang, Q., Atanasov, P, Wilkins, E. 1999.** Needle-type lactate biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(2): 203–210. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(98\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(98)00109-2)

**Yegane, A. 2015.** Balık tazeliğini belirlemek için yeni bir amperometrik biyosensör hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.

**Yin, T., Qin, W. 2013.** Applications of nanomaterials in potentiometric sensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 51: 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.06.009>

**Zhao, Z., Jiang, H. 2010.** Enzyme-based electrochemical biosensors. *Biosensors : Biosensors*, Ed.: P. A. Serra (Ed.), In Tech, 302 pp.

**Ziegler, C. 2000.** Cell-based biosensors. *Frensenius J Anal Chem*, 366: 552–559. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90091-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90091-5)

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özüm ÖZOĞLU  
Doğum Yeri ve Tarihi : Gelibolu / 15.11.1991  
Yabancı Dil : İngilizce (İyi düzeyde) ve İspanyolca (Temel Düzeyde)  
Eğitim Durumu  
Lise : Ankara Tınaztepe Lisesi (2008-2010)  
Kırklareli Atatürk Anadolu Lisesi (2006-2008)  
Lisans : Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü  
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümü (2018-2019) (Yatay Geçiş)  
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2016-2018)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Bursa Uludağ Üniversitesi (2018- Devam ediyor)

İletişim (e-posta) : [ozoglu@uludag.edu.tr](mailto:ozoglu@uludag.edu.tr), [ozum.ozoglu@gmail.com](mailto:ozum.ozoglu@gmail.com)

Yayımları :

- **Özoğlu Ö., Altuntaş-Güneş E. 2019.** Efficiency of a herbal liquid extract mixture for the preventing of salmonella growth in whipped cream. *Natural and Engineering Sciences*, 4(1), 65-75.
- **Özoğlu Ö., Çolak-Şaşmazer R., Erginkaya Z., Korukluoğlu M. 2018.** Surveying production and characteristics of homemade yogurt by using commercial probiotic cultures. International Congress on Food of Animal Origin, 8-11 Kasım 2018. Turkish Republic of North Cyprus, Sözlü Sunum.
- **Çolak-Şaşmazer R., Özoğlu Ö., Erginkaya Z., Korukluoğlu M. 2018.** Used some new techniques on analysis of food of animal origin. International Congress on Food of Animal Origin, 8-11 Kasım 2018, Turkish Republic of North Cyprus, Poster Sunumu.
- **Altuntaş, S., Özoğlu Ö., Korukluoğlu M. 2018.** Hayvansal gıdalarda gıda enfeksiyonu patojenleri: patojenite mekanizmaları ve kontrol. International Congress on Food of Animal Origin, 8-11 Kasım 2018, Turkish Republic of North Cyprus, Poster Sunumu.
- **Özoğlu Ö., Gümüştas M., Özkan A. S., Altuntaş-Güneş E. 2018.** Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve laktik asit üretim düzeyleri. Gastronomi Zirvesi, 22.03.2018-25.03.2018, Ankara-Türkiye, Sözlü Sunum.
- **Özoğlu Ö., Bayraktar B., Altuntaş-Güneş E. 2018.** Yeni doğum yapmış annelerin probiyotik ve prebiyotik terimlerini bilme durumunun araştırılması. 6. Uluslararası Fetal

Hayattan Çocukluğa “ilk 1000 gün” Gebe - Çocuk - Beslenme Kongresi, 14.03.2018-18.03.2018 Antalya-Türkiye, Sözlü Sunum.

• **Özoğlu, Ö., Ünal, M. A., Güneş-Altuntaş, E. 2017.** Biyosensörler : gıda ve sağlık alanında laktat biyosensörleri. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*, 2(2): 180–193.

• **Özoğlu Ö., Altuntaş-Güneş E. 2017.** Efficiency of a herbal liquid extract mixture for the preventing of Salmonella growth in whipped cream. 1st International Congress On Medicinal and Aromatic Plants ,10.05.2017-12.05.2017 Konya-Türkiye, Poster Sunumu.

• **Özoğlu Ö., Ünal M.A., Altuntaş-Güneş E. 2017.** Lactate biosensors in medical and food industry. International DNA Day and Genome Congress, 24.04.2017-28.08.2017 Kırşehir-Türkiye. Poster Sunumu.

• **Çarkçioğlu E., Özoğlu Ö., Tepe F., Demir H., Kor H., Bulut B., Candoğan K. 2016.** Adding value to mechanically deboned chicken meat by drying. 18.IUFOST, 21-25.08.2016 Dublin-İrlanda, Poster Sunumu