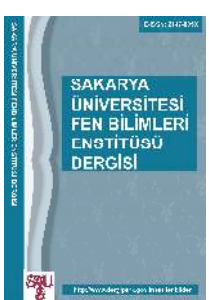
	SAKARYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ SAKARYA UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE		
	e-ISSN: 2147-835X Dergi sayfası: http://dergipark.gov.tr/saufenbilder		
	Geliş/Received 02-12-2016 Kabul/Accepted 01-07-2017	Doi 10.16984/saufenbilder.271304	

Etanol tayini İçin *Boletus edulis* doku homojenatı temelli yeni bir amperometrik biyosensör

Didem Tuncay^{*1}, Hakkı M. Özcan², Hülya Yağar³

ÖZ

Bu çalışmada, yenilebilir bir mantar olan *Boletus edulis*'in doku homojenatı kullanılarak, etanol tayini için doku temelli amperometrik bir biyosensör geliştirildi. Bu amaçla; mantar doku homojenatı, jelatin ve çapraz bağlayıcı ajan glutaraldehit yardımıyla camı karbon çalışma elektrotu üzerine immobilize edildi. Biyosensör cevabı üzerine pH ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu için; doku homojenatı miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehit konsantrasyonu belirlendi. Optimum koşullarda hazırlanan *B. edulis* doku temelli biyosensörün etanol için doğrusal tayin aralığı, 5.0–150 mM ve tayin sınırı, 2.5 mM olarak bulundu. Ayrıca, biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda, varyasyon katsayısı (V.K.) ve standart sapma (S.S.) değerleri sırasıyla % 0.7212 ve ± 0.7209 (n=10) olarak hesaplandı. Biyosensörün depo kararlılığı incelendi ve +4 °C'deki depolamanın 20. gününde aktivitesinin % 76.3'ünün koruduğu gözlemlendi. Hazırlanan biyosensör, etanol derişimi bilinen örneklerin analizi için kullanıldı.

Anahtar Kelimeler: Doku biyosensörü, Etanol, Amperometrik biyosensör, *Boletus edulis*

A new amperometric biosensor based on tissue homogenate of *Boletus edulis* for ethanol determination

ABSTRACT

In this study, an amperometric biosensor based on tissue for ethanol determination was constructed using tissue homogenate of *Boletus edulis* which is an edible mushroom. For this purpose, tissue homogenate of mushroom was immobilized onto the glassy carbon electrode using gelatin and glutaraldehyde which is cross-linking agent. Effects of pH and temperature on biosensor response were investigated. The amounts of tissue homogenate, amounts of gelatin and glutaraldehyde concentration were determined for optimization of immobilization conditions. The linear range for ethanol was 5.0-150 mM and the detection limit was 2.5 mM, of biosensor based on *B. edulis* tissue prepared under optimal conditions. Also, in repeatability studies, variation coefficient (C.V.) and standard deviation (S.D.) were calculated as 0.7212 % and ± 0.7209 , respectively. The biosensor retained 76.3% of its original activity after 20 days of storage at +4 °C. The prepared biosensor was used for analysis of ethanol samples with known concentrations.

Keywords: Tissue biosensor, Ethanol, Amperometric biosensor, *Boletus edulis*

¹ Trakya Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu-dleventer@gmail.com

² Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü-hmevlutozcan@trakya.edu.tr

³ Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü-hulyagar@yahoo.com

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Canlı sistemlerin en önemli bileşenlerinden biri olan enzimler, hücre metabolizmasında gerçekleşen kimyasal dönüşümlerin neredeyse tümünü kataliz etmektedirler. Katalitik aktivitelerinin doğası ve spesifitesi, onları analizler için mükemmel bir araç yapmaktadır. Enzimatik tepkimelerin, spektrofotometrik veya elektrokimyasal metotlarla kolaylıkla izlenebiliyor olması da enzimatik çalışmalar için oldukça önemli bir avantajdır [1].

Enzimler, biyosensörlerde en yaygın kullanılan biyoalgılama materyalleridir. Canlı sistemlerle ilgili birçok maddenin analizinde kullanılabilen binlerce enzimin varlığı, pratik ve ticari uygulamalar için enzim elektrotlarının üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Doğada 2.500'den fazla enzim tespit edilmiştir. Ancak, kullanılacak enzimin bulunduğu kaynaktan saf olarak elde edilmesi son derece karmaşık, zaman alıcı, oldukça maliyetli işlemlere gerek duymakta ve enzimlerin aktivitelerinde düşümlere neden olabilmektedir. Aynı zamanda, enzimlerin aktivite gösterebilmesi için reaksiyon ortamında kofaktör/koenzim sistemlerine ihtiyaç vardır [2]. Doku temelli biyosensörler, bu tip güçlüklerle karşı alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Dokular, enzimleri doğal çevreleriyle birlikte bulundukları için saflaştırma, kofaktör vb. gibi maliyetlere gerek duymadan biyosensör tasarımında kullanılabilir [3].

Günümüzde, yenilebilir mantar, bitkisel ve hayvansal dokular kullanılarak tasarlanan farklı doku temelli biyosensörler ile ilgili çalışmalara rastlanmaktadır. *Agaricus bisporus* [3] [4], Muz kabuğu [5] şalgam [6], ispanak [7], ebegümece [8], farelerin tat alma cisimciği [9] ile hazırlanan biyosensörler bunlar arasında yer almaktadır.

Şapkalı mantarlar, özellikle hayvansal ve bitkisel artıkların çürüme işlemlerinden sorumlu oksidatif enzimlerin önemli kaynaklarından. *Boletus edulis*, *Boletaceae* familyasından yenilebilen bir şapkalı mantar türüdür. *Bolet*, Latince "üstün mantar"; *edulis*, "yenebilen" anlamındadır. Oldukça lezzetli ve hoş kokulu olan bu mantar türü, Avrupa, Asya ve Amerika'nın kuzey bölgelerinde sıklıkla yetişmektedir. Ülkemizde "Ayı" veya "Çörek" mantarı, yurt dışında "Çörek", "Cep" veya "Porcini" mantarı olarak isimlendirilmektedir. Haziran-Ağustos ayları ile

Eylül-Kasım ayları arasında meşe, huş, kayın, çam, ladin ağaçlarının altında ve çevresinde, asidik yapılı topraklarda, ormanlık yolların kenarlarında ve çürümüş yaprakların altında bol miktarda görülmektedir [10]. Literatür incelendiğinde, *B. edulis* doku temelli etanol biyosensörü ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Etanol tayini, farklı endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için oldukça önem taşımaktadır. Bu uygulamalar arasında; alkollü içecekler, gıda maddeleri, kozmetik ve farmasötik ürünlerin analizleri sayılabilir [11-12]. Bunlara ek olarak, klinik ve adli tıpta yapılan analizler, tarım ve çevre ile ilgili analizlere yönelik uygulamalar da önem taşımaktadır [1, 13]. Etanol tayini için; gaz difüzyon sürekli akış enjeksiyon analizi (FIA), [14], elektroanaliz [15], FIA-elektroanalitik tayin [16], Infrared (IR) spektroskopisi [17], amperometrik yöntemler [18], direkt enjeksiyonlu gaz kromatografisi (GC)/alev iyonizasyon dedektörlü (FID) [19], Gaz Fazı Ayrımlı (Head-space) Sıvı Enjeksiyon Sistemli GC/FID [20], yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)/Fourier Dönüşümlü (FT) IR [21], HPLC [22], filtrelenmiş modlu ışık algılama [23], Gaz Fazı Ayrımlı (Head-space) Sıvı Enjeksiyon Sistemli GC/kütle spektrometresi [24], FT-yakın infrared (NIR) spektrometresi ve FT-Raman spektrometresi [25] gibi birçok analitik metot önerilmiştir. Ancak, bu metotlar zahmetli ekstraksiyon ve ön ayırma işlemlerine gerek duymaktadırlar ve kullanılan cihazlar kompleks ve pahalıdır. Bu nedenle, son yıllarda etanol tayini için basit, ucuz, duyarlı, çabuk sonuç veren ve yüksek seçiciliğe sahip biyosensörler geliştirilmektedir [17]. Literatürde, etanol tayini için; alkol oksidaz [12, 26-27], alkol oksidaz-peroksidaz bienzim sistemi [28-29], alkol dehidrojenaz [1, 11, 30-33] gibi enzim temelli biyosensörler geliştirildiği bildirilmektedir.

Alkol oksidaz (AOX; Alkol:O₂ oksidoredüktaz, EC 1.1.3.13), alkollerin aldehite dönüşümünün katalizinden sorumlu düşük molekül ağırlıklı bir enzimdir. Tepkime sırasında serbest O₂'ni elektron alıcısı olarak kullanan oligomerik bir flavoproteindir. Eşitlik (1), alkol oksidazın kataliz reaksiyonunu göstermektedir. O₂'nin güçlü oksitleyici özelliği nedeniyle bu tepkimeler tek yönlüdür. Bu reaksiyon sırasında, flavin adenin dinükleotit molekülü (FAD) kofaktör görevi görerek FADH₂'ye indirgenir ve moleküler oksijenin hidrojen peroksida dönüşümü ile yeniden doğal formuna yükseltgenir.



Oksidaz katalizli tepkimelerin takibi için kullanılan klasik yollar, O₂ derişimindeki azalma veya H₂O₂ derişimindeki artışın ölçülmesidir [34].

Bu çalışmada, etanol tayini için O₂ derişimindeki azalma takip edilerek *B. edulis* doku homojenatı temelli bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı.

Biyosensörün çalışma koşulları (pH, sıcaklık) ve tasarımına ait (doku miktarı, glutaraldehit konsantrasyonu ve jelatin konsantrasyonu) bazı parametreler optimize edildi.

Tasarım ve optimizasyon denemeleri gerçekleştirildikten sonra biyosensörün doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik ve depo kararlılığı gibi analitik özellikleri de belirlendi. Ayrıca, standart ekleme metodu kullanılarak örnek analizi gerçekleştirildi.

2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR (ASSAYS)

2.1. Kimyasallar (Chemicals)

Bu çalışmada, Kırklareli-Demirköy çevresinden temin edilen, yenilebilir *B. edulis* mantarları kullanıldı. Mantarlar kullanılabildiği kadar -80 °C'de depolandı.

İmmobilizasyon işlemlerinde kullanılan glutaraldehit, jelatin ve diğer kimyasallar Sigma, St. Louis, USA firmasından satın alındı. Etanol (% 99.9 saflıkta) Merck firmasından satın alındı. Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

2.2. Cihazlar (Equipments)

Potansiyostat (PalmSense, Netherlands), camısı karbon elektrot, Pt karşı elektrot ve Ag/AgCl referans elektrotu (Basi, W. Lafayette, USA) kullanıldı. Tüm denemeler, bir termostatlı su banyosu (Nüve BM 302, UK) yardımıyla sabit sıcaklıkta gerçekleştirildi.

2.3. Biyosensörün Hazırlanması (Preparing of biosensor)

Biyoaktif tabakanın hazırlanması için, 200 mg *B. edulis* mantarı tartıldı ve 750 µL, 0.2 M sitrat-difosfat tamponu (pH 5.0) ile cam doku homojenizatöründe homojenize edildi. Biyoaktif

tabaka, her gün taze doku örnekleri kullanılarak hazırlandı.

Hazırlanan mantar dokusu homojenatından 300 µL alınarak, 10 mg toz jelatin ile karıştırıldı. Homojenat ve jelatin karışımı, jelatinin çözülmesi için sıcaklığı 38 °C'ye ayarlanan su banyosunda arada çalkalanarak 15 dakika inkübe edildi. Elde edilen jelatin-mantar dokusundan otomatik pipet yardımı ile 30 µL alındı ve camısı karbon elektrot yüzeyine yayıldı. Elektrot, +4 °C'de 30 dakika bekletildi. Süre sonunda elektrot, saf suda hazırlanan, hacimce % 1.25'lik glutaraldehit çözeltisine daldırıldı ve +4 °C'de 15 dakika daha bekletildi. Böylece, glutaraldehit çözeltisi ile biyoaktif tabakanın çapraz bağlanma işlemi gerçekleştirilerek membran kararlılığı sağlandı. İşlem sonunda, hazırlanan biyosensörden aşırı glutaraldehitin uzaklaştırılması için sensör, destile su ile birkaç kez yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi.

2.4. Ölçüm Yöntemi (The method of measurement)

Geliştirilen biyosensör ile etanol derişimi tayini, mantar dokusunda bulunan alkol oksidazın enzimatik katalizi sırasında tükenen oksijen miktarına bağlı olarak, devreden geçen akımın ölçülmesi ile belirlendi.

Çalışma elektrodu olarak *B. edulis* doku homojenatının immobilize edildiği camısı-karbon elektrot, karşı elektrot olarak Pt ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrodu kullanıldı. Bu üç elektrot, çalışma tamponunun içinde bulunduğu termostatik bir reaksiyon hücresine yerleştirildi ve çözelti manyetik karıştırıcı ile sabit hızda sürekli karıştırıldı. Reaksiyon boyunca, -700 mV potansiyel farkı sabit değerde uygulandı. Uygulama başladıktan bir süre sonra sistem akımı sabitlendiğinde, termostatik reaksiyon hücresine etanol çözeltisi enjekte edildi. Enjeksiyon sonrasında, indirgenen oksijen miktarına bağlı olarak akım miktarının azalmaya başladığı ve enzimatik reaksiyonun tamamlanması ile sabit bir değere ulaştığı gözlemlendi. Ölçülen akım değerleri kaydedildi.

Tüm ölçümler en az iki kez tekrarlandı.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

3.1. Doku Biyosensörü için Çalışma Koşullarının Optimizasyonu (Optimization of the assay conditions for the tissue biosensor)

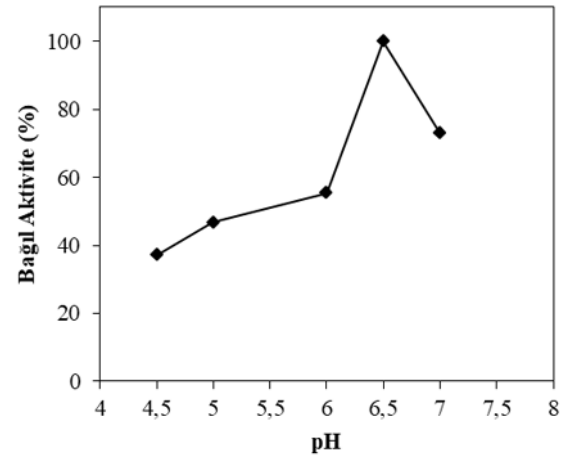
Doku temelli etanol biyosensörünün çalışma koşullarının belirlenmesi için; ölçüm ortamının pH ve sıcaklık değerlerinin biyosensör cevabı üzerine etkisi araştırıldı.

3.1.1. pH Optimizasyonu (Optimization of pH)

Enzimatik doku biyosensörünün substrata karşı gösterdiği aktivite değeri, ölçüm ortamının pH'ına büyük ölçüde bağlıdır. Bu değerlere göre, dokudaki enziminin biyoaktivitesi ve immobilize dokunun davranışları büyük ölçüde değişir. Aşırı koşullar, biyosensörün verdiği akım cevaplarında düşüşlere ve düzensizliklere neden olabilmektedir [2-3, 34].

Optimum pH değerinin belirlenmesi için ölçüm ortamına, pH değeri 4.5.-7.5 aralığında değişen, 0.2 M sitrat-difosfat tamponu eklendi ve doku biyosensörünün 428 mM etanol için verdiği cevaplar belirlendi. Elde edilen akım değişimlerinden yararlanarak, % Aktivite değerleri hesaplandı. Şekil 1'de, en yüksek aktivite değerine karşılık gelen pH değerinin 6.5 olduğunu ve pH 4.5-6.5 aralığındaki aktivite artışının pH 7.0'de düşüşe geçtiği görülmektedir. Literatürde, etanol tayini için hazırlanan *A. bisporus* mantar doku biyosensörünün en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değerinin 7.5 olduğu görülmektedir [3]. Ayrıca maya, fungus ve bitki gibi farklı kaynaklardan elde edilen dokulara bağlı olarak etanol biyosensörlerinin optimum pH değerleri 5.0-9.5 arasında değişebilmektedir. Optimum pH'lardaki bu değişimi farklı immobilizasyon metodlarının kullanılması ile açıklanabilir [35].

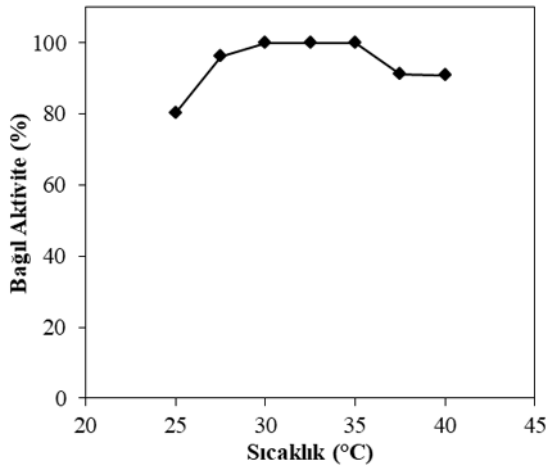
Bu sonuçlara göre, *B. edulis* doku temelli biyosensör için yapılacak tüm denemelerin, pH değeri 6.5 olan 0.2 M sitrat-difosfat tamponu ile gerçekleştirilmesine karar verildi.



Şekil 1. *B. edulis* doku homojenatı temelli biyosensörün aktivitesine pH etkisi, (428 mM etanol için, 30 °C) (The pH effect to activity of biosensor based on tissue homogenate of *B. edulis*, for the ethanol of 428 mM, 30 °C)

3.1.2. Sıcaklık Optimizasyonu (Optimization of temperature)

B. edulis doku biyosensörüne çalışma sıcaklığının etkisini incelemek amacıyla, pH değeri 6.5 olan 0.2 M sitrat-difosfat tamponu ile hazırlanan ölçüm ortamının sıcaklığı, 25-40 °C aralığında değiştirildi ve her bir sıcaklık için doku biyosensörünün 428 mM etanole karşı verdiği cevaplar belirlendi. Elde edilen değerler kullanılarak, Sıcaklık-% Bağıl Aktivite grafiği çizildi (Şekil 2). Grafik incelendiğinde, en yüksek aktivite değerine 30 °C'de ulaşıldığı, 32.5 °C ve 35 °C sıcaklıklarda da bu değerlerin sabit kaldığı görülmektedir. Sıcaklık arttırıldığında biyosensörün aktivitesindeki düşüş, biyoaktif tabakada bulunan jelatinin yapısındaki bozulma ile ilişkilendirilebilir. Bu nedenle, en yüksek aktivite değerinin ölçüldüğü en düşük sıcaklık olan 30 °C optimum sıcaklık değeri olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık değerinde, jelatinin yapısındaki bozulmalar önlenebileceğinden biyosensörün kullanım ömrü artmış olacaktır. *A. bisporus* mantar doku biyosensörü için optimum sıcaklık 35 °C olarak belirlenmiş ve 35 °C'ye kadar süren aktivite artışı 40 °C'de düşüş göstermiştir [3]. Bulunan sonuçlar benzerlik göstermektedir.



Şekil 2. *B. edulis* doku homojenatı temelli biyosensörün aktivitesine sıcaklık etkisi, 428 mM etanol için, 0.2 M sitrat-difosfat tamponu, pH 6.5 (The temperature effect to activity of biosensor based on tissue homogenate of *B. edulis*, for the ethanol of 428 mM, citrate-diphosphate buffer of 0.2 M, pH 6.5)

3.2. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu (Optimization of the immobilization conditions)

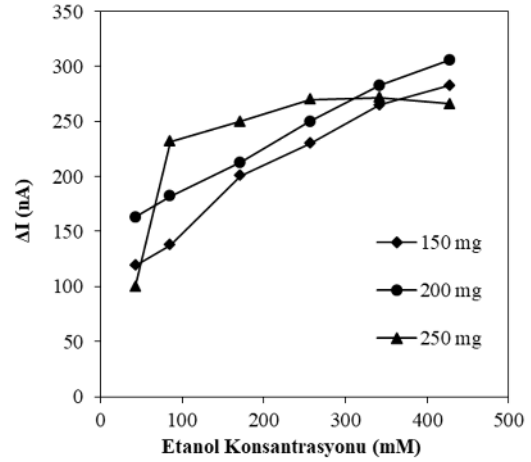
Doku temelli etanol biyosensörünün geliştirilmesinde, optimum immobilizasyon koşullarının belirlenmesi için; mantar dokusu miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi araştırıldı. Tüm denemeler, belirlenen optimum çalışma koşullarında (0.2 M, pH 6.5 sitrat-difosfat tamponu, 30 °C) en az iki kez tekrarlanarak gerçekleştirildi.

3.2.1. Doku Miktarının Etkisi (The effect of tissue amount)

Mantar doku homojenatı miktarının geliştirilen biyosensörün cevabına etkisini incelemek amacıyla, 10 mg jelatin ve % 1.25 glutaraldehit oranı değerleri sabit tutularak, 150, 200 ve 250 mg *B. edulis* mantar doku homojenatı içeren biyosensörler hazırlandı. Şekil 3, hazırlanan biyosensörlerin farklı etanol derişimleri için (42.8, 85.6, 171.2, 256.8, 342.4, 428 mM) verdiği akım derişimlerini nA cinsinden göstermektedir.

Şekil 3'te görüldüğü gibi, doku miktarının 150 mg'dan 200 mg'a çıkarılması ile biyosensör cevabı lineer olarak artmıştır. Doku miktarı 250 mg'a çıkarıldığında ise; etanol konsantrasyonundaki artışın biyosensör cevabına etkilediği, yüksek etanol konsantrasyonlarında biyoaktif tabakanın etanol ile doyduğu

görülmektedir. Bu nedenle, optimum doku homojenatı miktarı 200 mg olarak seçildi.

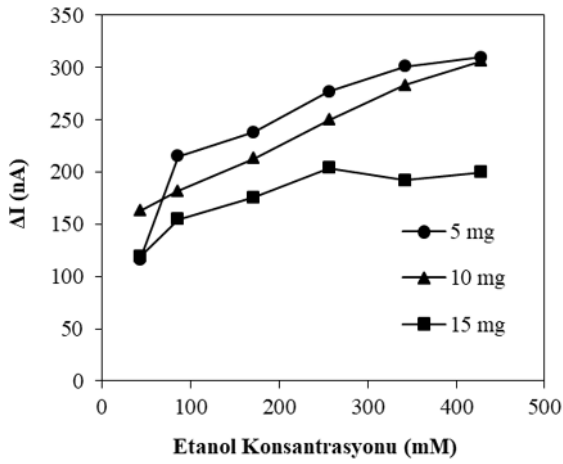


Şekil 3. 300 µL, pH 5.0 0.2 M sitrat-difosfat tamponunda hazırlanan *B. edulis* doku homojenatı miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi (0.2 M sitrat-difosfat tamponu, pH 6.5, 30 °C) (The effect of amount of *B. edulis* tissue homogenate prepared in 0.2 M, 300 µL of citrate-diphosphate buffer at pH 5.0) (0.2 M of citrate-diphosphate buffer, pH 6.5, 30 °C)

B. edulis mantar dokusunun farklı bileşimleri, biyosensörün etanole karşı verdiği tepki özelliklerini etkilemektedir. Biyoaktif tabakada bulunan doku miktarı artışı, alkol oksidaz miktarı artışına ve böylece enzim aktivitesindeki yükselmeye nedendir. Bunun yanında, doku miktarının artırılması biyoaktif tabakayı kalınlaştırarak substrat ve O₂ gazı difüzyonunu zorlaştırabilir. Ayrıca, doku miktarının artması ortamdaki protein miktarının, dolayısıyla glutaraldehitin oluşturduğu çapraz bağ sayısının artmasına da yol açar. Bu durum, substratın enzimin aktif merkezine ulaşmasını sterik engel nedeniyle zorlaştırır. Akyılmaz ve Dinçkaya'nın da mantar dokusu homojenatından 200 mg kullandığı belirtilmiştir [3].

3.2.2. Jelatin Miktarının Etkisi (The effect of gelatine amount)

Jelatin miktarının etkisi ile ilgili denemeler, kullanılan doku homojenatı miktarı (200 mg) ve glutaraldehit yüzdesi (% 1.25) sabit tutularak optimum çalışma koşullarında gerçekleştirildi. Sırasıyla 5 mg, 10 mg ve 15 mg jelatin kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Glutaraldehit ile çapraz işlemi tamamlandıktan sonra her bir elektrotun etanolün farklı derişimlerine karşı cevapları kaydedildi. Sonuçlar Şekil 4'de verildi.



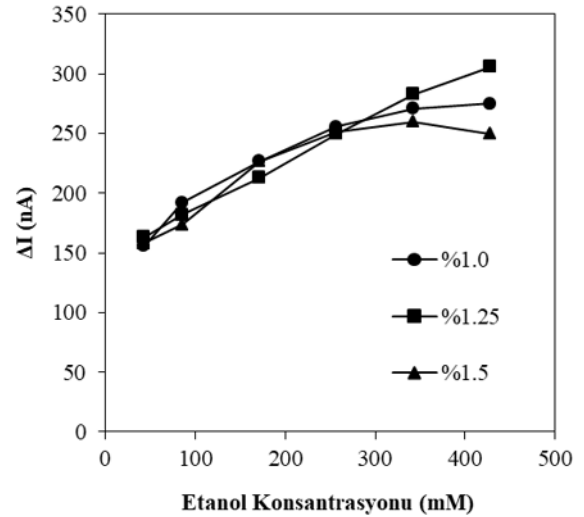
Şekil 4. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi (0.2 M sitrat-difosfat tamponu, pH 6.5, 30 °C) (The effect of amount of gelatine on the response of biosensor) (0.2 M of citrate-diphosphate buffer, pH 6.5, 30 °C)

5 mg jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensör, hazırlanan diğer biyosensörlere göre daha yüksek cevaplar vermiştir. Ancak, etanol konsantrasyonu düşük tutulduğunda 5 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörün cevabının çok düşük olduğu görülmektedir. Biyoaktif tabakanın ince olması, substrat ve O₂ difüzyonunu kolaylaştırmakta ancak kaçan madde miktarını arttırabilmektedir. Özellikle, düşük etanol konsantrasyonları için cevaptaki azalmanın nedeninin bu durum olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda, biyoaktif tabakanın ince olması, tabakanın dayanıklılığını azaltarak biyosensörün tekrarlanabilirlik özelliğini olumsuz yönde etkileyebilir. Tüm bu neden-sonuç ilişkilerine dayanarak, biyosensör tasarımında 10 mg jelatin kullanılmasına karar verildi. Jelatin bazlı doku biyosensörleri için benzer sonuçlar rapor edilmiştir [3-4].

3.2.3. Glutaraldehit Derişiminin Etkisi (The effect of glutaraldehyde concentration)

Glutaraldehit, biyolojik moleküllerin katı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu için kullanışlı bir çapraz bağlayıcıdır. Çapraz bağlayıcının yüzdesi, biyoaktif tabakanın elektroda immobilizasyonu için önemli bir parametredir. Bu parametrenin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi amacıyla, sırasıyla % 1.0, % 1.25 ve % 1.5'lik glutaraldehit çözeltileri kullanılarak önceden belirlenen immobiliz doku biyosensörleri hazırlandı. Hazırlanan biyosensörlerin etanolün farklı derişimleri için verdiği cevaplara bağlı olarak lineer grafikleri çizildi. Denemelerden elde edilen sonuçlara göre çizilen lineer grafik incelendiğinde; etanol derişimi artışının farklı derişimlerde glutaraldehit kullanılarak hazırlanan

biyosensör cevaplarında da benzer oranlarda artışlara neden olduğu görülmektedir (Şekil 5). % 1.25 glutaraldehit kullanılarak hazırlanan biyosensörden elde edilen cevapların daha yüksek olduğu ve bu değerinde daha iyi bir lineerlik gözlemlendiği belirlendi. Bu nedenle, bu çalışma için glutaraldehit derişimi % 1.25'lik (v/v) olarak seçildi. Benzer bir sonuç, muz kabuğu doku temelli biyosensör için rapor edilmiştir [5].



Şekil 5. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi (0.2 M sitrat-difosfat tamponu, pH 6.5, 30 °C) (The effect of concentration of glutaraldehyde on the response of biosensor) (0.2 M of citrate-diphosphate buffer, pH 6.5, 30 °C)

3.3. B. edulis Doku Homojenatı Temelli Biyosensörün Karakterizasyonu (The characterization of biosensor based on B. edulis tissue homogenate)

B. edulis doku temelli biyosensör için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Biyosensör, optimum immobilizasyon koşullarına göre hazırlandı. Yukarıda belirlenen çalışma koşullarında (0.2 M, pH 6.5 sitrat-difosfat tamponu, 30 °C) gerçekleştirilen denemeler ile biyosensörün etanol tayini için lineer aralık tayini gerçekleştirildi, tekrarlanabilirlik, uygulama kararlılığı, depo kararlılığı özellikleri araştırıldı. Konsantrasyonu bilinen etanol örnekleri ile örnek çalışması yapıldı. Tüm denemeler, en az iki kez tekrarlanarak gerçekleştirildi.

3.3.1. Lineer Aralık (Linear range)

Hazırlanan biyosensör ile yapılan çalışmalarda doğru ölçüm alınabilmesi için, ölçüm ortamına analitin belirli miktarlarda ilave edilmesi sonucu, değişen analit konsantrasyonu ile sinyal

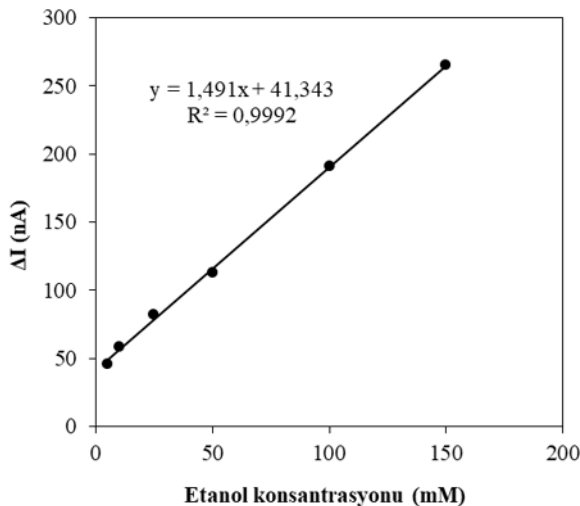
değişimlerinin doğrusal eğilim gösterdiği lineer bölgeyi tanımlamak gerekmektedir.

B. edulis doku biyosensörünün lineer aralık tayini için, ölçüm ortamına belirli konsantrasyonlarda her bir etanol çözeltisi eklenmesinden sonra artan etanol konsantrasyonu (M) ile ölçülen akım değişimleri ΔI (nA) arasındaki ilişkiyi belirten bir kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 6). $R^2 = 0.9992$ olmak üzere elde edilen doğrusal grafiğin denklemi $y = 1.491x + 41.343$ şeklindedir. Denklemden y , nA cinsinden akımı temsil eder ve x , mM cinsinden etanol konsantrasyonudur.

Şekil 6, *B. edulis* biyosensörünün etanol için doğrusal cevap aralığının 5.0-150 mM konsantrasyonları arasında olduğunu göstermektedir. Ayrıca biyosensörün tayin sınırı 2.5 mM olarak belirlenmiştir.

Boujtita ve arkadaşları, modifiye karbon pasta elektrota immobilize edilmiş alkol dehidrojenaz temelli amperometrik bir biyosensörün etanol için lineer aralık değerini 0.22-1.25 mM, Akyılmaz ve Dinçkaya mantar dokusu temelli amperometrik bazlı etanol sensörünün lineer aralık değerini 0.2-20 mM, Lubrano ve arkadaşları oksijen ve hidrojen peroksit bazlı alkol sensörünün lineer aralık değerini 3.4-85.95 mM arası olarak tanımlamışlardır [3, 11, 36].

Bu sonuçlarla kıyaslandığında; tasarlanan *B. edulis* biyosensörünün oldukça geniş bir tayin aralığına sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 6. *B. edulis* doku homojenatı temelli biyosensörün 5.0-150 mM aralığındaki etanol derişimleri için kalibrasyon eğrisi (0.2 M sitrat-difosfat tamponu, pH 6.5, 30 °C) (Calibration curve of biosensor based on tissue homogenate)

for ethanol concentrations ranging from 5.0-150 mM) (0.2 M of citrate-diphosphate buffer, pH 6.5, 30 °C)

Tablo 1, literatürde yayınlanan ve enzimatik olmayan bazı yöntemlerin, analitik performanslarını göstermektedir. Tabloya göre, etanol tayini için en düşük tayin sınırı ve en geniş lineer aralık sonuçları, Tarnowski ve Korzeniewski'nin pulse amperometrisini kullanarak gerçekleştirdiği çalışmada elde edilmiştir. Geliştirdiğimiz biyosensörün lineer tayin aralığı ve tayin sınırı ile karşılaştırıldığında, HPLC/FTIR, fotometrik ve NIR yöntemlerine göre daha iyi sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bu yöntemlerin bazıları hassas ve güvenilir olmakla birlikte, karmaşık ve zaman alan tekniklere, pahalı cihazlara, eğitilmiş operatörlere, damıtma gibi ayırma işlemlerine gerek duymaktadırlar. Bu gibi dezavantajlar, enzimatik biyosensörler ile aşılabilmektedir.

Tablo 1. Etanol tayini için kullanılan enzimatik olmayan teknikler (Non-enzymatic techniques use for quantification of ethanol)

Teknik	Tayin Sınırı	Lineer aralık	Ref
Pulse amperometre, Pt elektrot	0.02 mM	0.02-1700 mM	[37]
HPLC/FTIR	-	1-10 mg/mL	[38]
Fotometri, Cr(VI)→Cr(III) (600 nm)	% 5	% 5-40	[39]
NIR, akış enjeksiyonlu	10 g/L	200-500 g/L	[40]

3.3.2. Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Doku biyosensörünün tekrarlanabilirlik özelliği, eşit miktarda etanol (100 mM) içeren 10 standart çözelti ile test edildi. Standart sapma (S.S.), varyasyon katsayısı (V.K) ve ortalama değerleri sırasıyla, 0.721, % 0,7212, 99.97 mM olarak hesaplandı. Bu değerler göz önüne alındığında, biyosensörün güvenilirliğinin bir ölçüsü olan varyasyon katsayısı üst sınır değerinin % 5 den oldukça düşük olduğu belirlendi. Bu durum, tasarladığımız biyosensörün etanol tayini için belirtilen sınırlar içerisinde oldukça güvenilir olduğunu göstermektedir.

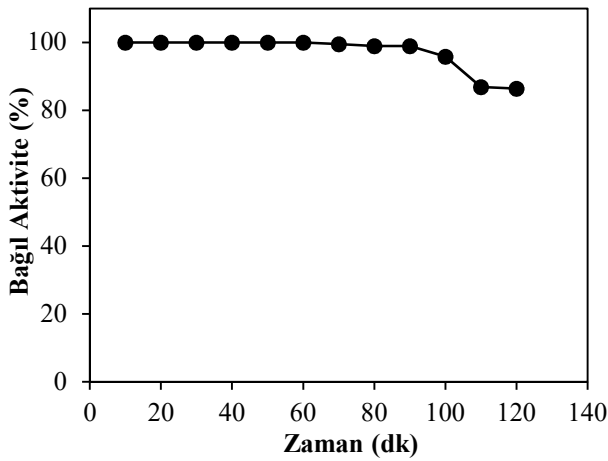
Uygulama Kararlılığı (Operational stability)

B. edulis doku biyosensörünün uygulama kararlılığını belirlemek amacıyla, önceden

belirlenen immobilizasyon şartlarına göre mantar dokusu temelli biyosensör hazırlandı. Optimize edilen çalışma koşullarında (30 °C, 0.2 M sitrat-difosfat tamponu, pH 6.5) hazırlanan biyosensör ile 10 dk aralıklarla sabit etanol derişiminde (100 mM) ölçümler alındı. Elde edilen değerler ile Bağlı Aktivite (%)-Zaman (dk) grafiği çizildi (Şekil 7).

B. edulis doku biyosensörünün, 6 ölçüm sonunda aktivitesini % 100 oranında koruduğu belirlendi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, 12. ölçüme kadar bağlı aktivite % 86'nın altına düşmemiştir. Bu durum, etanol tayini için geliştirilen biyosensörün uygulama kararlılığının, dolayısıyla biyoaktif tabakanın stabilitesinin yani fiziksel kararlılığının iyi olduğunu göstermektedir.

Akyılmaz ve Dinçkaya'nın geliştirdiği mantar dokusu temelli amperometrik bazlı etanol biyosensörünün, 60 deneme sonunda gösterdiği aktivitenin % 82'sini koruduğu rapor edilmiştir [3].



Şekil 7. Uygulama kararlılığı (Operational stability)

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda etanol tayinine yönelik geliştirilen ortamdaki indirgenen O₂ miktarına göre akım cevabı veren biyosensörlerin karakteristikleri Tablo 2'de rapor edilmiştir. Tablo 2 incelendiğinde, AOX temelli ve indirgenen O₂ miktarını ölçen amperometrik biyosensörler ile ilgili az sayıda çalışma bulunduğu görülmektedir. Oksijen esaslı biyosensörlerin avantajı, farklı örneklerdeki bileşenlerden kaynaklı elektrokimyasal parazitleri önlemesidir. Etanol tayini için geliştirdiğimiz doku biyosensörü, diğer çalışmalara göre daha geniş bir aralıkta doğrusal cevap vermektedir. Bu durum, birçok pratik uygulamada etanolün kantitatif analizleri için yöntemin geniş yer bulacağını göstermektedir. Wen ve arkadaşları tarafından geliştirilen biyosensör, uygulama ve depo kararlılığı özellikleri açısından oldukça başarılıdır. *B. edulis* doku temelli biyosensör ile diğer çalışmalar karşılaştırıldığında, immobilizasyon desteği ve yöntemindeki farklılıkların biyosensörlerin karakteristik özelliklerinde yarattığı değişiklikleri ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu tip amperometrik sistemlerde O₂ miktarına duyulan bağımlılık, cihazın doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini azaltabilmektedir. Arka plan sinyali yüksek olduğu için, tespit edilebilir minimum konsantrasyon değeri çok düşük değerlere karşı duyarlı değildir [47].

Tablo 2. Çeşitli AOX tabanlı biyosensörlerin performanslarının karşılaştırılması (Comparison of performances of various AOX-based biosensors)

AOX İmmobilizasyon Tekniği	AOX kaynağı	Tayin Sınırı	Lineer aralık	Uygulama Kararlılığı	Depo Kararlılığı	Ref
Jelatin ile homojenize edilen mantar dokusunun GA ile çapraz bağlanması	<i>A. bisporus</i>	0.2 mM	0.2–20 mM	% 82 (60 deneme, 10 saat içinde)	-	[3]
Maya hücrelerinin jelatine GA ile çapraz bağlanması	<i>Candida tropicalis</i>	0.5 mM	0.5–7.5mM	% 50 (7 saat içinde)	% 42 (27 gün)	[44]
Katalaz ile birlikte, GA kullanarak naylon ağa kovalent bağlama	<i>H. polymorpha</i>	1 mg/l	1–25 mg/l	400 deneme (2 hafta)	-	[45]
Kitosan/AOX-yumurta kabuğu (kesikli)	<i>Hansenula sp.</i>	30 µM	0.06-0.8mM	% 100 (20 ölçüm, 8 saat içinde)	% 86.6 (90 gün)	[46]
Jelatin ile homojenize edilen mantar dokusunu GA ile çapraz bağlama	<i>B. edulis</i>	2.5 mM	5.0-150 mM	% 86 (12 deneme)	% 76.3 (20. gün)	Bu çalışma

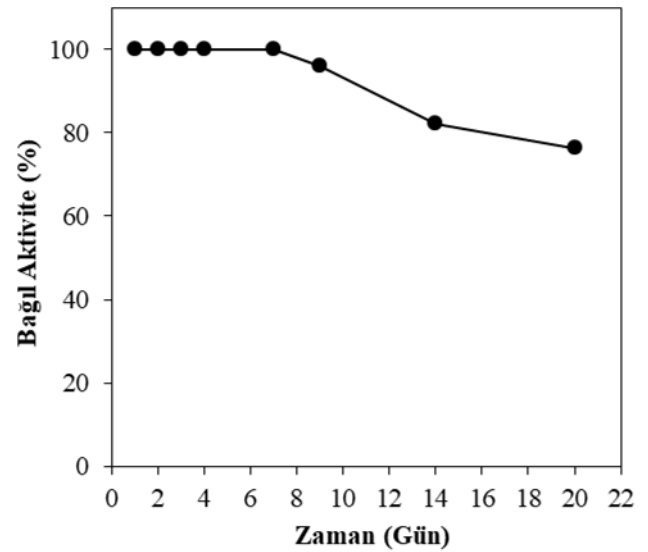
3.3.3. Depo Kararlılığı (Storage stability)

Biyosensörün depo kararlılığını belirlemek için, optimum çalışma koşullarında (30 °C ve pH 6.5, 0.2 M sitrat-difosfat tamponu), 20 gün boyunca 85.6 mM'lık etanole verdiği cevaplar incelendi. Periyodik ölçümler dışındaki süreçte, hazırlanan biyosensör yüzeyinin kurumaması için ıslatılmış bir pamuğun bulunduğu beherde +4 °C'de bekletildi. Doku biyosensörünün ilk 7 günlük periyotta, günlük alınan ölçümlere göre aktivitesini kaybetmediği; 9, 14. ve 20. günlerde aktivitesinin sırasıyla % 95.9, % 82 ve % 76.3'ünü koruduğu belirlendi (Şekil 8).

Biyosensörlerin depolama kararlılıkları, kullanılan immobilizasyon yöntemi ile ilişkilidir. Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış jelatin ve doku temelli biyosensörler ile gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde, Topçu ve arkadaşlarının tasarladığı *A. bisporus* mantar doku temelli biyosensörün başlangıç aktivitesinin ilk 4 günde aktivitesinin % 96.6, 14. günde de % 86'sını koruduğu; Özcan ve Sağıroğlu tarafından tasarlanan muz kabuğu doku biyosensörünün ilk 5 gün aktivitesini kaybetmediği, 20. günde aktivitesinin % 76.4' ünü koruduğu belirtilmektedir [4-5]. Sonuçlar, çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. Uzun süreli uygulamalar için, biyosensörlerin depo kararlılığı önemli ölçütlerden biridir. Enzimin doğal çevresi ile birlikte immobilize edildiği doku temelli biyosensörler, saf enzim immobilizasyonu ile geliştirilen biyosensörlere oranla daha yüksek depo kararlılığına sahip oldukları belirtilmektedir [41-43].

Genel olarak immobilizasyon materyali olarak jelatinin kullanıldığı biyosensörlerde, uygun koşullarda korunduğu halde tabakanın kısmen

kuruması depo kararlılıklarını 10-30 gün arasında sınırlandırmaktadır [1].



Şekil 8. Depo kararlılığı (Storage stability)

3.3.4. Örnek Uygulamaları (Sample assays)

Bu çalışmada, etanol derişimi bilinen örnek çözeltileri kullanılarak (20, 40 ve 75 mM) *B. edulis* temelli doku biyosensörünün verdiği cevapların doğruluğu analiz edildi. Tüm ölçümler, optimum çalışma koşullarında en az üç kez tekrar edilerek gerçekleştirildi. Her bir örnek için elde edilen akım değişimleri ΔI (nA) belirlendi. *B. edulis* doku biyosensörü için çizilen kalibrasyon eğrisinin (Şekil 6.) doğru denklemi kullanılarak, elde edilen akım değişimlerine karşılık gelen derişim değerleri hesaplandı.

Tablo 3'de verilen sonuçlar değerlendirildiğinde, 40 ve 75 mM lık etanol örneklerinin doğruluk yüzdesinin daha yüksek olduğu görüldü.

Tablo 3. Reaksiyon ortamında bulunan belirli derişimdeki Etanol içeriğinin *B. edulis* doku homojenatı temelli biyosensör ile test edilerek karşılaştırılması (Comparison of ethanol content at specific concentration in the reaction medium with biosensor based on tissue homogenate of *B. edulis*)

Etanol örnekleri	Eklenen miktar (mM)	Kalibrasyon eğrisine göre hesaplanan miktar (mM)*	Doğruluk %
Örnek 1	4. 20	5. 16.85 ± 0.42	6. 84.25
Örnek 2	7. 40	8. 39.01 ± 0.47	9. 97.53
Örnek 3	10. 75	11. 74.22 ± 0.28	12. 98.96

*Denemeler üç kez tekrarlanmış olup değerler bu ölçümlerin ortalaması (\pm standart sapma) alınmıştır.

4. SONUÇLAR (CONCLUSION)

Bu çalışmada, ilk kez *B. edulis* yenilebilir mantarı kullanılarak, doku temelli bir amperometrik biyosensör geliştirildi. AOX enzimi açısından aktif 200 mg doku homojenatı, % 1.25 glutaraldehit yardımıyla 10 mg jelatine çapraz bağlanarak camı grafit elektrot üzerine başarıyla immobilize edildi. Geliştirilen doku biyosensörü, biyosensör teknolojisinin pratik ve ekonomik analizlere imkan veren ürün geliştirme stratejisine uygun olarak, enzim, kofaktör gibi maliyetli kimyasallara ihtiyaç duyulmadan, basit bir immobilizasyon işlemi ile hazırlandı.

Karakteristik özellikleri ile ilgili yapılan araştırmalar, biyosensörün etanol tayini için geniş ve doğrusal bir tayin aralığına (5.0-150 mM) sahip olduğunu, uzun süreli ve tekrarlanabilir şekilde kullanılabilirliğini öngörmektedir. Ayrıca, yapılan örnek analizleri, biyosensörün tayin edebilirliğinin uluslararası kabul edilebilir hata kriterleri kapsamına girecek şekilde olduğunu göstermektedir. Geliştirilen bu biyosensörün alkollü içeceklerdeki etanol miktar tayininde kullanım potansiyelini belirlemek için, gerçek alkol numuneleri ile örnek analizleri ve girişim denemelerinin bundan sonraki çalışmalarda yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKÇA (REFERENCES)

- [1] A. M. Azevedo, D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral, L. P. Fonseca, «Ethanol biosensors based on alcohol oxidase, Rewiev,» *Biosensors and Bioelectronics*, 21, pp. 235–247, 2005.
- [2] G. Wen, Z. Li, M. M. F. Choi, «Detection of ethanol in food: A new biosensor based on bacteria,» *Journal of Food Engineering*, 118, pp. 56-61, 2013.
- [3] E. Akyilmaz, E. Dinckaya, «A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum,» *Talanta*, 53, pp. 505-509, 2000.
- [4] S. Topcu, M. K. Sezginurk, E. Dinckaya, «Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects,» *Biosensors and Bioelectronics*, 20, pp. 592–597, 2004.
- [5] H. M. Ozcan, A. Sagiroglu, «A novel amperometric biosensor based on banana peel (*Musa cavendish*) tissue homogenate for determination of phenolic compounds,» *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 38, pp. 208-214, 2010.
- [6] N. C. Sekar, L. Ge, S. A. M. Shaeghc, S. H. Ngc, S. N. Tana, «A mediated turnip tissue paper-based amperometric hydrogen peroxide biosensor,» *Sensors and Actuators B*, 210 pp.336–342, 2015.
- [7] M. K. Sezginurk, E. Dinckaya, «A novel amperometric biosensor based on spinach (*Spinacia oleracea*) tissue homogenate for urinary oxalate determination,» *Talanta*, 59, pp. 545-551, 2003.
- [8] M. K. Sezginurk, E. Dinckaya, «Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate,» *Talanta*, 65, pp. 998-1002, 2005.
- [9] L. Qiao, L. Jiao, G. Pang, J. Xie, «A novel pungency biosensor prepared with fixing taste-bud tissue of rats,» *Biosensors and Bioelectronics*, 68 pp. 454–461, 2015.
- [10] A. Vizzini, A. Mello, S. Ghignone, C. Sechi, P. Ruiu, P. Bonfante, «*Boletus edulis* complex: from phylogenetic relationships to specific primers, » *Pagine di Micologia* 30, pp. 49–52, 2008.
- [11] M. Boujtita, M. Chapleau, N. El Murr, «Biosensors for analysis of ethanol in food: effect liquid of the pasting,» *Analytica Chimica Acta*, 319, pp. 91-96, 1996.
- [12] M. Boujtita, J. P. Hart, R. Pittson, «Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer,» *Biosensors & Bioelectronics*, 15, pp. 257–263, 2000.
- [13] H. Liden, A. R. Vijayakumar, L. Gorton, G. Marko-Varga, «Rapid alcohol determination in plasma and urine by column liquid chromatography with biosensor detection,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17 pp. 1111-1128, 1998.
- [14] W. Künnecke, R. D. Schmid, «Gas-diffusion dilution flow-injection method for the determination of ethanol in beverages without sample pretreatment,» *Analytica Chimica Acta*, 234, pp. 213-220.

- [15] W. H. Chan, A.W. M. Lee, P. X. Cai, «Differential-pulse polarographic microdetermination of ethanol and its application to beer analysis.» *Analyst*, 117, pp. 1509-1517, 1992.
- [16] J. Mohns, W. Kunnecke, «Flow analysis with membrane separation and time based sampling for ethanol determination in beer and wine,» *Analytica Chimica Acta*, 305, pp. 241-247.
- [17] A. Perez-Ponce, S. Garrigues, M. Guardia, «Vapour generation-Fourier transform infrared direct determination of ethanol in alcoholic beverages,» *Analyst*, 121, pp. 923-928, 1996.
- [18] D. J. Tarnowski, C. Korzeniewski, «Amperometric detection with membranebased sampling for percent-level determinations of ethanol,» *Analytica Chimica Acta*, 332, pp. 111-121, 1996.
- [19] A. Tangerman, «Highly sensitive gas chromatographic analysis of ethanol in whole blood, serum, urine, and fecal supernatants by the direct injection method,» *Clinical Chemistry*, 43, pp.1003-1009, 1997.
- [20] D. G. McCarver-May, L. Durisin, «An accurate, automated, simultaneous gaschromatographic headspace measurement of whole-blood ethanol and acetaldehyde for human in vivo studies,» *Journal of Analytical Toxicology*, 21, pp. 134-141, 1997.
- [21] R. Vonach, B. Lendl, R. Kellner, «High performance liquid chromatography (HPLC) with real time Fourier transform infrared (FTIR) detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines,» *Journal of Chromatography A*, 824, pp. 159-167, 1998.
- [22] T. Yarita, R. Nakajima, S. Otsuka, T. Ihara, A. Takatsu, M. Shibukawa, «Determination of ethanol in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography-flame ionization detection using pure water as mobile phase,» *Journal of Chromatography A*, 976, pp. 387-391, 2002.
- [23] H. Yuan, M. M. F. Choi, W. H. Chan, L. Zhou, K. Wang, «Dual-light source excitation for mode-filtered light detection,» *Analytica Chimica Acta*, 481, pp. 301-310, 2003.
- [24] S. Apers, E. V. Meenen, L. Pieters, A. Vlietinck, «Quality control of liquid herbal drug preparations: ethanol content and test on methanol and 2- propanol,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, pp. 529-537, 2003.
- [25] L. S. Mendes, F. C. C. Oliveira, P. A. Z Suarez, J. C. Rubim, «Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier-transform (FT)-near-infra-red and FT Raman spectrometries,» *Analytica Chimica Acta*, 493, pp. 219-231, 2003.
- [26] G. G. Guilbault, B. Danielsson, C. F. Mandenlus, K. Mosbach, «Enzyme electrode and thermistor probes for determination of alcohols with alcohol oxidase,» *Analytical Chemistry*, 55, pp.1582-1585, 1983.
- [27] L. V. Shkotova, A. P. Soldatkin, M. V. Gonchar, W. Schuhmann, S. V. Dzyadevych, «Amperometric biosensor for ethanol detection based on alcohol oxidase immobilized within electrochemically deposited Resydrol film,» *Materials Science and Engineering: C*, 26, pp. 411-414, 2006.
- [28] K. Johansson, G. J. Petterson, L. Gorton, G. Marko-Varga, E. Csoregi, «Reagentless amperometric biosensor for alcohol detection in column liquid chromatography based on co-immobilized peroxidase and alcohol oxidase in carbon paste,» *Journal of Biotechnology*, 31, pp. 301-316, 1993.
- [29] A. R. Vijayakumar, E. Csoregi, A. Heller, L. Gorton, «Alcohol biosensor based on coupled oxidase-peroxidase system,» *Analytica Chimica Acta*, 327, pp. 223-234, 1996.
- [30] C. -X. Cai, K.H. Xue, Y.-M. Zhou, H. Yang, «Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode,» *Talanta*, 44, pp.339-347, 1997.
- [31] M. Niculescu, T. Erichsen, V. Sukharev, Z. Kerenyi, E. Csöregi, W. Schuhmann, «A quinohemoprotein alcohol dehydrogenase based reagentless amperometric biosensor for ethanol monitoring during wine fermentation,» *Analytica Chimica Acta*, 463, pp. 39-51, 2002.
- [32] M. Niculescu, R. Mieliauskiene, V. Laurinavicius, B. Csöregi, « Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in

- wines using pyrroloquinoline quinone dependent dehydrogenases based biosensors,» *Food Chemistry*, 82, pp. 481-489, 2003.
- [33] M. Bilgi, E. Ayranci, «Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase,» *Sensors and Actuators B* 237 pp. 849-855, 2016.
- [34] P. Goswami, S. S. R. Chinnadayala, M. Chakraborty, A.K. Kumar, A. Kakoti, «An overview on alcohol oxidases and their potential applications,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 pp. 4259-4275, 2013.
- [35] N. C. Sekara, S. A. M. Shaeghb, S. H. Ngb, L. Gec, S. N. Tana, «A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian Blue-modified screen-printed electrodes,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204 pp. 404-420, 2014.
- [36] G. J. Lubrano, M. H. Faridnia, G. Palleschi, G. G. Guilbault, «Amperometric alcohol electrode with extended linearity and reduced interferences,» *Analytical Biochemistry*, 198-1 pp.97-103, 1991.
- [37] D. J. Tarnowski, C. Korzeniewski, «Amperometric detection with membrane-based sampling for percent-level determinations of ethanol,» *Anal. Chim. Acta*, 332 (2-3), pp. 111-121, 1996.
- [38] R. Vonach, B. Lendl, R. Kellner, «High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines,» *J. Chromatogr. A* 824 (2), pp. 159-167 1998.
- [39] I. L. Mattos, R. P. Sartini, E. A. G. Zagatto, B. F. Reis, «Spectrophotometric flow injection determination of ethanol in distilled spirits and wines involving permeation through a silicon tubular membrane,» *Anal. Sci.* 14, pp. 1005-1008, 1998.
- [40] P. Tipparat, S. Lapanantnoppakhun, J. Jakmune, K. Grudpan, «Determination of ethanol in liquor by near-infrared spectrophotometry with flow injection,» *Talanta* 53, pp. 1199-1204, 2001.
- [41] H. B. Yildiz, L. Toppare, «Biosensing approach for alcohol determination using immobilized alcohol oxidase,» *Biosensors and Bioelectronics*, 21, pp. 2306-2310, 2006.
- [42] N. G. Patel, K. Meier, K. Cammann, G. C. Chemnitz, «Screen printed biosensors using different alcohol oxidases,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, 75 (1-2), pp. 101-110, 2001.
- [43] A. Curulli, F. Valentini, S. Orlanduci, M. L. Terranova, G. Palleschi, «Pt based enzyme electrode probes assembled with Prussian Blue and conducting polymer nanostructures,» *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (6), pp. 1223-1232, 2004.
- [44] E. Akyilmaz E. Dinckaya, «An amperometric microbial biosensor development based on *Candida tropicalis* yeast cells for sensitive determination of ethanol,» *Biosensors and Bioelectronics*, 20, pp. 1263-1269, 2005.
- [45] C. Verduyn, J.P. van Dijken, W.A. Scheffers, «A simple, sensitive, and accurate alcohol electrode,» *Biotechnol. Bioeng.* 25 (4), pp. 1049-1055, 1983.
- [46] G. Wen, Y. Zhang, S. Shuang, C. Dong, M.M.F. Choi, «Application of a biosensor for monitoring of ethanol,» *Biosens. Bioelectron.* 23, pp. 121-129, 2007.
- [47] A.W. Bott, «Electrochemical methods for the determination of glucose,» *Curr. Separations* 17 (1), pp. 25-31, 1998.