

**T.C.  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
GIDA TEKNOLOJİSİ BİLİM DALI**

**AFLATOKSİN M1 TAYİNİNE YÖNELİK  
ELEKTROKİMYASAL İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

**Gülcan SÖZEN İBEK**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Seval DAĞBAĞLI**

**II. Danışman  
Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFÇILAR**



**MANİSA-2019**

**Gülcan  
SÖZEN İBEK**

**AFLATOKSİN M1 TAYİNİNE YÖNELİK  
ELEKTROKİMYASAL İMMÜNSENÖR GELİŞTİRİLMESİ**

**2019**

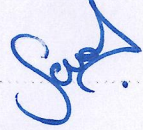
**Tez Sırtı örneği**

## TEZ ONAYI

Gülcan SÖZEN İBEK tarafından hazırlanan "Aflatoksin M1 Tayinine Yönelik Elektrokimyasal İmmünoşensör Geliştirilmesi" adlı tez çalışması 08/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

**Dr. Öğr. Üyesi Seval DAĞBAĞLI**  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

**Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR**  
Ege Üniversitesi



Jüri Üyesi

**Dr. Öğr. Üyesi Aslı AKPINAR**  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Gülcan SÖZEN İBEK





# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇİNDEKİLER .....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ .....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Mikotoksinler ve Mikotoksikozis.....	3
2.1.1. Mikotoksinlerin Oluşumuna Etki Eden Faktörler .....	5
2.2. Aflatoksinler .....	8
2.2.1. Aflatoksinlerin Toksisitesi.....	12
2.2.2. Aflatoksin M1 .....	13
2.2.3. Çeşitli Teknolojik İşlemlerin Aflatoksin M1 Üzerindeki Etkileri...	14
2.2.4. Aflatoksin Tayininde Kullanılan Yöntemler ve Önemi .....	15
2.3. Biyosensörler.....	16
2.3.1. Algılama (Biyokimyasal) Kısımına Göre Biyosensörler .....	23
2.3.1.1. Enzimatik Biyosensörler .....	23
2.3.1.2. Nükleik Asit Biyosensörleri .....	23
2.3.1.3. Mikrobiyal Biyosensörler .....	24
2.3.1.4. İmmunosensörler .....	24
2.3.2. Çevirici Kısımına Göre Biyosensörler.....	26
2.3.2.1. Optik Biyosensörler .....	26
2.3.2.2. Piezoelektrik (Kütleyle Dayalı)Biyosensörleri.....	27
2.3.2.3. Termal (Kalorimetrik) Biyosensörler .....	27
2.3.2.4. Elektrokimyasal Biyosensörler.....	28
• Potansiyometrik Biyosensörler .....	28
• Amperometrik Biyosensörler .....	29
• İmpedimetrik Biyosensörler .....	29
• Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi .....	30
2.4. Biyosensör Uygulamaları .....	32
2.4.1. Klinik Tanı.....	32
2.4.2. Çevresel Tarama .....	32
2.4.3. Yiyecek Kontrolü.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	36
3.1. Materyal.....	36
3.1.1. Toksinler ve Antikorlar.....	36
3.1.2. Elektrotlar .....	36
3.1.3. Kimyasallar ve Çözeltiler .....	37
3.2. Yöntemler.....	39
3.2.1. Boş Elektrot Yüzeylerinde AFM1 Tayini.....	39
3.2.2. İmmunosensör tasarımı için uygun antikor ve hedef toksin derişimlerinin belirlenmesi.....	43
3.2.3. Altın Nanopartikülle Yapılan Elektrokimyasal Çalışmalar .....	43
3.2.4. Süt Örnekleri ile AFM1 Tayini .....	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	46

4.1. Anti AFM1 Derişiminin AFM1 Tayinine Etkisi.....	48
4.2. En Uygun Hedef Toksin Derişiminin Belirlenmesi .....	49
4.3. Süt Örneklerinde AFM1 Tespiti .....	50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	60
KAYNAKLAR .....	63
ÖZGEÇMİŞ .....	68



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AB</b>	Avrupa Birliği
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AFM1</b>	Aflatoksin M1
<b>AFM2</b>	Aflatoksin M2
<b>AFB1</b>	Aflatoksin B1
<b>AFB2</b>	Aflatoksin B2
<b>AFG1</b>	Aflatoksin G1
<b>AFG2</b>	Aflatoksin G2
<b>Au-NP</b>	Altın nanopartikülü
<b>Aw</b>	Su Aktivitesi
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albümin
<b>Ca</b>	Kalsiyum
<b>EIS</b>	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim İlişkili İmmün Test)
<b>FB1</b>	Fumonisin B1
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
<b>FAO</b>	Food and Agricultural Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
<b>Fe</b>	Demir
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
<b>ICA</b>	International Council on Archives (Uluslararası Arşiv Konseyi)
<b>IARC</b>	The International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü)
<b>K</b>	Potasyum
<b>LC</b>	Liquid Chromatography (Sıvı Kromatografisi)
<b>Mg</b>	Magnezyum
<b>OTA</b>	Okratoksin A
<b>P</b>	Fosfor
<b>RASFF</b>	Rapid Alert System for Food and Feed (Gıda ve Yem İçin Hızlı Alarm Sistemi)
<b>SCPE</b>	Tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar
<b>TLC</b>	Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)

<b>TGK</b>	Türk Gıda Kodeksi
<b>UV</b>	Ultraviolet Işıklar
<b>WHO</b>	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
<b>Zn</b>	Çinko
<b>ZEA</b>	Zearalenon





## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. <i>Aspergillus parasiticus</i> 'un elektron mikroskopundaki görüntüsü .....	8
Şekil 2.2. Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları .....	10
Şekil 2.3. Biyosensör yapısı .....	17
Şekil 3.1. Tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar (SCPE –Dropsens) sensör yüzeyleri ve üçlü elektrot sistemleri.....	37
Şekil 3.2. SCPE yüzeyine antikör molekülünün kovalent bağlarla bağlanması .	40
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan elektrokimyasal yöntem basamakları.....	42
Şekil 3.4. Altın nanopartiküllere (Au-NP) dayalı elektrokimyasal AFM1 analizine yönelik çalışma .....	44
Şekil 4.1 Anti AFM-1 kaplı sensör yüzeyinde, a) AFM-1 ile, b) non spesifik OTA ile bağlandıktan sonra, c) yalnızca antikör molekül ile kaplı yüzeylerden elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri. ....	47
Şekil 4.2. SCPE sensör yüzeylerinde, anti AFM1 bağlandıktan önce, sonra ve AFM1 ve OTA ile birleştikten sonra A) BSA ile blokaj yapılmadan B) BSA ile yüzey blokajı yapılarak elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri .....	48
Şekil 4.3. Artan derişimlerde anti AFM 1 kaplı sensör yüzeylerinden AFM 1 ile hedef toksin ile birleşmeden önce (A), AFM 1 ile (B) ve OTA (C) ile birleştikten sonra elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri.....	49
Şekil 4.4. 0.2 ppm anti AFM 1 kaplı sensör yüzeylerinde artan derişimlerde (A)AFM 1 ile (B)OTA ile birleştikten sonra elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri.....	50
Şekil 4.5. SCPE sensör yüzeylerinde, anti AFM1 bağlanmadan önce, sonra ve AFM1 ve OTA ile birleştikten sonra elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri .....	51
Şekil 4.6. AuNP modifiye edilmemiş (A) ve edilmiş (B) sensör yüzeylerinde, anti AFM1 bağlanmadan önce, sonra ve AFM1 ve OTA ile birleştikten sonra elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri .....	52

## TABLO DİZİNİ

## Sayfa

Tablo 2.1. Türkiye’de gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri ...	11
Tablo 3.1. Projede kullanılan elektrot .....	36
Tablo 3.2. Projede kullanılan kimyasallar .....	38
Tablo 3.3. Projede kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	38



## TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Pınar Kara Kadayıfçılar'a, bilgi ve tecrübesi ile lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan, tecrübeleri ile beni aydınlatan ve desteğini hiç eksik etmeyen, kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum sevgili danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seval Dağbağlı'ya ve öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan aileme ve eőime yürekten teşekkür ederim.

Gülcan SÖZEN İBEK  
Manisa, 2019



## ÖZET

Yüksek Lisans

### Aflatoksin M1 Tayinine Yönelik Elektrokimyasal İmmunosensör

GÜLCAN SÖZEN İBEK

Manisa Celal Bayar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seval DAĞBAĞLI

#### II. Danışman: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFÇILAR

Aflatoksin M1 (AFM1), küfler tarafından aflatoksin B1'in yemler aracılığı ile süt hayvanına geçmesi ve vücutta metabolize olması sonucu oluşan bir mikotoksindir. Bu nedenle süt ve süt ürünleri AFM1 içerebilir. Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından aflatoksin M1, Grup 1 karsinogen bileşik olarak bildirilmiştir. Bu nedenle AFM-1'in tayini önemlidir. Projenin amacı, aflatoksin M1'in hızlı ve kesin tayinine yönelik bir immunosensör geliştirmektir. Tasarlanan immunosensörde, AFM1'e spesifik bir antikör molekül, tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanmasının ardından AFM1 ile muamele edilerek birleşmesi sağlanmıştır. Yüzeyde oluşan bu antikör/aflatoksin kompleksi elektrokimyasal impedans spektrometri tekniği (EIS) ile tayin edilmiştir. Tasarlanan immunosensörün seçiciliği anti- AFM1 ile etkileşime girmeyen bir toksin olan okratoksin A (OTA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece herhangi bir işaretlemeye gerek duyulmadan işaretli bir hızlı tanı sistemi geliştirilmiş olacaktır. Sensör yüzeylerine yabancı bir molekül veya yapının bağlanmaması için BSA ile blokaj çalışmaları yapılmış olup BSA ile kaplanan ve kaplanmayan yüzeylerin yanıtları değerlendirilmiştir. Bulgulara göre AFM1 /OTA etkileşimlerinin BSA kaplı yüzeylerde daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmada tek kullanımlık perde baskılı elektrotlar ile en uygun antikör derişimi 0.2 ppm olarak belirlenmiştir. Elde edilen spektrometri verileri değerlendirildiğinde, toksin derişiminin artmasıyla yanıtlarında arttığı ancak en uygun ayırımın 0.1 ppm toksin derişimiyle elde edildiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tayin sınırı (LOD) 0.3 ppb olarak hesaplanmıştır. Çalışmada altın nanopartikül (AuNP) ile modifiye edilmiş ve edilmemiş sensör yüzeylerde farklı süt numuneleriyle çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Analizler verileri incelendiğinde AuNP modifiye yüzeyin yanıtının daha yüksek olduğu bulunmuş ve hassasiyetin oldukça arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre tasarımı yapılan biyosensör sistemin, gıda güvenliğini tehdit eden diğer toksinlerin analizleri için temel olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Aflatoksin M1, immünosensör, elektrokimya

2019, 80 sayfa

## **ABSTRACT**

**M.Sc.**

### **Development of Electrochemical Immunosensor for the Detection of Aflatoxin M1**

**GÜLCAN SÖZEN İBEK**

**Manisa Celal Bayar University  
Institute of Science and Technology  
Department of Food Engineering**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Seval DAĞBAĞLI**

**Co-Supervisor: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFÇILAR**

Aflatoxin M1 (AFM-1) is a mycotoxin which is a consequence of the metabolism by the cow of aflatoxin B1 that is commonly produced by the fungal strains. Therefore milk and milk products may be contain aflatoxin M1. Aflatoxin M1 has been reported as Group 1 carcinogen by the International Cancer Research Institute (IARC). Therefore, the determination of AFM1 is important. The aim of the project is to develop an immunosensor for the rapid and precise determination of aflatoxin M1. In the designed immunosensor, an AFM1-specific antibody molecule was covalently bound to the disposable screen-printed carbon electrode surface. It was then treated with AFM1 to bind. This antibody / aflatoxin complex formed on the surface was determined by electrochemical impedance spectrometry technique (EIS). Ochratoxin A (OTA) toxin that does not interact with anti- AFM1 was used to determine the selectivity of the designed immunosensor. Thus, an unmarked rapid recognition system without any marking has been developed. In order not to bind a foreign molecule or structure to the surface, blockage studies, blockage studies were performed with BSA and the responses of BSA coated and uncoated surfaces were evaluated. In this study, the most suitable antibody concentration was determined as 0.2 ppm by using disposable screen printed electrodes. When the obtained spectrometry data were evaluated, it was observed that the increase in toxin concentration increased the answers but the most appropriate separation was obtained with 0.1 ppm toxin concentration. According to the results, the limit of determination (LOD) was calculated as 0.3 ppb. Gold nanoparticles (AuNP) modified and unmodified sensor surfaces were studied with different mk samples. When the analysis data were examined, it was found that the response of AuNP modified surface was higher and the sensitivity increased considerably. It was concluded that the biosensor system designed according to these results may be the basis for the analysis of other toxins threatening food safety.

**Key words:** Aflatoxin M1, immunosensor, elektrochemistry

**2019, 80 pages**

## 1. GİRİŞ

Mikotoksinler, hasat sırasında ya da depolama aşamasında ürünlerin üzerinde gelişen küfler tarafından üretilmektedir. Kontamine olmuş gıdaların tüketimi ile insan ve hayvan sağlığı üzerine önemli toksik etkilere neden olmaktadır. Mikotoksinlerin, gıda katkıları ve pestisit kalıntılarından daha tehlikeli olduğu ve teratojenik, mutajenik, nefrotoksik, immunosupressif ve kanserojenik özellikte olduğu bildirilmiştir [1].

Hayvanların beslenmesinde kullanılan yemlerin mikrobiyolojik ve mikotoksikolojik yapısı büyük önem taşımaktadır. Ayrıca kullanılan yemlerin hijyenik kalitesi hem hayvanlar hem de hayvanlardan elde edilen ürünleri tüketen insanlar için çok önemlidir. Son zamanlarda sağlıklı ve kaliteli ürünlerin tüketilmesine yönelik tüketicilerin bilinçlendirilmesiyle gıda güvenliğini daha da önemli hale getirmiştir. Gıda güvenliğinin önem kazanmasının bir diğer sebebi de uluslararası ticari boyut kazanmasıdır [2]. En güzel örneği ise AB ülkeleri arasında dolaşan ürünlerde mikotoksinlerden kaynaklanan geri dönüşler olduğu zaman bu ürünlerin hangi ülkelerden geldiği günlük rapor halinde hızlı alarm sistemlerinde (RASFF) duyurulmaktadır.

Dünyada her yıl üretilen tarımsal ürünlerin yaklaşık %25'inin, yemlerin ise daha yüksek oranda mikotoksinlerle kontamine olduğu bildirilmiştir [3, 4]. İnsan ve hayvanları mikotoksinlerin olumsuz etkilerinden korumak için gıda ve yem maddelerinde bu toksinlerin limit değerleri belirlenmiştir. Gelişmiş ülkeler ise ihracat ve ithalatları sırasında bu limitleri göz önünde tutmaktadırlar [5].

Mikotoksinler özellikle *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* ve *Alternaria* gibi küfler tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir [6]. Aflatoksin, Trikotesenler (deoksinivalenol, T-2 toksin), Okratoksin A (OTA), Zearalenon (ZEA), Fumonisin B1 (FB1), tremorjenik toksinler ve ergot alkoloitler halk sağlığı ve ekonomik açıdan önemli olan mikotoksinlerdir [5].

Aflatoksin M1, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *A.nomius* tarafından aflatoksin B1'in yemler aracılığı ile süt hayvanına geçmesi ve bu hayvan tarafından vücutta metabolize edilmesi sonucu oluşan bir formdur. Oluşan bu toksin

süt ve süt ürünleri aracılığıyla insanlara geçmektedir [7]. Uluslararası Kansere Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından Aflatoksin M1, yapılan son çalışmalardan sonra Grup 1 karsinojen bileşik olarak bildirilmiştir [8, 9]. Bu toksin, ısı işlemler veya pastörizasyon ile parçalanmadığından süt ve süt ürünlerinden elde edilen ürünlerde aflatoksin kalıntıları olacağından en riskli ürünler arasında yer almaktadır. Bu nedenle Aflatoksin M1'in tayini çok önemlidir. Günümüzde bu toksinin tayini sıvı kromatografi, ince tabaka kromatografi ve ELISA kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmanın amacı ise günümüzde kullanılan rutin analizlere alternatif olarak gıda toksinlerinin analizinde tercih edilen antijen-antikor ilişkisine dayalı immüno-sensörler tasarımını gerçekleştirmektir.





## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mikotoksinler ve Mikotoksikozis

Doğada çok yaygın olarak bulunan bazı küf türleri ortam sıcaklığı ve nemin uygun olduğu şartlarda tarım ürünlerinde, bunların hammaddelerinde ve bu ürünlerden hazırlanmış gıda ve yemlerde gelişip üremekte ve toksik metabolitler sentezlemektedirler. Gıdalarda gelişen küflerin oluşturduğu bu toksik maddelere mikotoksin adı verilir [6, 10, 11]. Mikotoksin, Yunancada fungus anlamına gelen —Myces— ve Latince zehir anlamına gelen —Toxicum— kelimelerinden oluşmaktadır. Mikotoksinler küflerin ikincil (sekonder) metabolitleri olup iz miktarda (mg/L ve µg/L seviyelerinde) sentezlenirler. Çok az miktarı bile insanın sağlığını olumsuz etkilemektedir. Mikotoksinler çeşitli küf türleri tarafından sentezlenebilirler. Hatta tek bir küf çeşidi aynı anda birden fazla ve farklı yapılarda mikotoksin sentezleyebilir.

Mikotoksinlerin bazıları sadece kısıtlı sayıda oluşan küf türleri tarafından üretilirken bazıları ise daha fazla cinse ait çeşitli türler tarafından üretilmektedir. Örneğin; *Claviceps*, *Fusarium* ve *Alternaria* cinsine ait küfler bitki patojeni olarak bilinmekte ve bitkinin yetiştirme aşamasında veya hasat sırasında ürünle kontamine olduğundan “tarla küfleri” olarak adlandırılmaktadır. *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler ise saprofitiktir. Özellikle hasat sonrası depolamada %70-90 nispi nem değerlerinde (tahıl nemi %18) sorun oluşturduğundan “depo küfleri” olarak adlandırılmaktadır [12]. Örneğin, *Aspergillus flavus*'un hem bitkinin yetişmesi hem de depolama aşamasında uygun sıcaklık ve nem koşullarında ürüne kolonize olabildiği ve toksin oluşturduğu belirtilmektedir [13, 14].

Doğada 100'den fazla küf türü üzerinden üretilen 400'e yakın ikincil metabolitin toksik etkiye sahip olduğu belirtilmektedir [15, 16]. FAO (Food and Agricultural Organization), dünyada üretilen tarım ürünlerinin yaklaşık %25'inin mikotoksinlerle kontamine olduğunu rapor etmiştir [13, 17, 18]. Ayrıca halk sağlığı ve ekonomik açıdan oluşturduğu sorunlardan dolayı Aflatoksinler, Okratoksin A (OTA), Fumonisin B1 (FB1), Triketesinler (deoksinivalenol, T-2 toksin), Zearalenon (ZEA) ve Patulin üzerinde en fazla durulan mikotoksin türlerini oluşturmaktadır [13, 17, 19].

Mikotoksinleri üreten mantarların küf sporları rüzgar ve hava akımlarıyla taşınarak her yerde bulunabilirler. Bu taşıma işlemiyle birlikte küf sporları uygun koşullar oluştuğunda üreyip gelişerek mikotoksin sentezlemeye başlarlar. Ortaya çıkan mikotoksinler ya hayvanlar tarafından tüketilerek insanlara bulaşmakta ya da mikotoksinli bitkilerin insanlar tarafından doğrudan tüketilmesiyle mikotoksinlerin insanlara bulaşması söz konusudur [18, 20].

Mikotoksinli yemlerin tüketilmesiyle hayvanlarda akut ve kronik zehirlenme, verim kaybı, ağırlık artışında azalma ve immunosupresyona neden olmaktadır. Ayrıca mikotoksinler genotoksik etkileriyle birlikte aflatoksin, okratoksin ve fumonisin gibi mikotoksinlerin çeşitli kanser tiplerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Mikotoksinli yemleri tüketen hayvanlardan elde edilen ürünlerin de insanlar tarafından tüketilmesi ciddi sağlık sorunlarını beraberinden getirdiği için bu durum halk sağlığı açısından çok önemlidir [13, 20, 21].

Mikotoksinler ile kontamine olmuş ürünleri tüketen insan ve hayvanlarda ortaya çıkan hastalığa ise mikotoksikozis denir [13, 18]. Mikotoksikozda görülen belirtilerin etkileri insanların kişisel özelliklerine yani beslenme şekli, kilosu, fiziksel durumu gibi faktörlere bağlı olarak farklılıklar gösterebilir.

Küflerin insan ve hayvanlarda hastalığa sebep olduğu ve bu hastalıklardan dolayı toplu ölümlere neden olabileceğine dair ilk bilgiler milattan önceki dönemlere kadar uzanmaktadır. Bilinen ilk mikotoksikozis vakası ise *Claviceps purpurea*'ın çavdar ve diğer tahıl tanelerinde üreyerek salgıladığı hallusinogenil etkiye sahip ergot alkaloidinden kaynaklanan ve "Ergotizm" olarak adlandırılan mikotoksikozisdir.

İkinci Dünya Savaşı yıllarında ise küflü tahıl ürünlerinin tüketilmesiyle Rusya'nın değişik bölgelerinde birçok insan bu tip mikotoksikozislerden etkilenmiş ve çok sayıda ölümler meydana gelmiştir. Bu olaylar o zamanlarda sıradan bir hastalık olarak görülmüştür [19]. Fakat 1960 yılı ve sonrasında İngiltere'de 100.000'den fazla hindi palazının, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.000.000 genç alabalığın (Forelle) ani ölümü üzerine araştırmalar yapılmış, sonucunda ise vakanın bir mikotoksikozis olduğu saptanmıştır. Bu hastalığa ise "Turkey X Disease" ya da "Hindi X Hastalığı" adı verilmiştir. Yapılan araştırmalara göre, Brezilya'dan İngiltere'ye getirilmiş olan,

küflenmiş yer fıstığı küspelerinin katılmış olduğu yemlerin hindiler tarafından tüketilmesi sonucu toplu ölümler gerçekleşmiştir. Bu olayın araştırılması ile *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından salgılanan toksinlerin bu toplu ölüme sebep olduğu saptanmıştır. Bu araştırma öncesine kadar gerçekleşmiş bütün mikotoksikozis rahatsızlıkları çok önemsenmemiş ve normal bir hastalık olarak görülmüştür. Toplu ölüme yol açan bu hastalık insanların bu yönde daha çok araştırma yapılmasına neden olmuştur. Hindi X Hastalığı mikotoksikozis olayları için tam bir dönüm noktası olmuştur. Daha sonraki araştırmalarda ise bu bileşiğin *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından meydana gelen bir metabolit olduğu saptanmıştır. Bu toksine kendisini oluşturan fungusun baş harflerinin birleştirilmesiyle “Aflatoksin” adı verilmiştir [13, 18, 22, 23].

Türkiye’de ise 1967 yılında Kanada’ya ihraç edilmiş olan fındıkların aflatoksin içermesi nedeniyle iade edilmesinin ardından bu yönde çalışmalara başlamıştır. Bununla beraber 1994 yılında Almanya’ya ihraç edilmiş olan kırmızıbiberler ve ABD’ye ihraç edilmiş olan fıstıklar da aynı sebepten dolayı geri iade edilmiştir. Hatta son zamanların gündem konularından biri olmaya devam etmektedir [22].

### **2.1.1. Mikotoksin Oluşumuna Etki Eden Faktörler**

Mantarların çoğalarak mikotoksin sentezleyebilmesi için gerekli koşulları aşağıdaki gibi özetleyebiliriz.

**Nemin Etkisi:** Ortamın ve besin maddesinin rutubeti küf gelişimi açısından son derece önemlidir. Ortamın nisbi nem oranıyla küf gelişimi arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Nem arttıkça küf gelişimi de o oranda artar ve kolaylaşır. Ayrıca küflerin gelişerek mikotoksin sentezleyebilmesi için gerekli nem koşulları birbirinden farklılık göstermektedir. Küfler üreyebilmek için daha nemli ortamlara ihtiyaç duyarlar. Toksin salgılamak ise üreme için gerekli olan nem oranından daha düşük nem oranları yeterli olmaktadır. Su aktivitesi (aw) gıda içerisinde bağlı olmayan suyu ifade etmekte ve besinin nem konusunda yüzde (%) su içeriğini göstererek küflerin gelişimi için bize bilgi vermektedir. Küf gelişimi için su aktivitesi 0.90-0.80, toksin oluşumu için su aktivitesi 0.90-0.85 optimum değerlerdir. Su aktivitesi 0.75’in altında çoğalan küfler depo küfleri olarak tanımlanır. Su aktivitesi 0.65’den aşağıda küf gelişimi çok yavaşken 0.90’ın üzerinde olan ortamlarda ise bakteri ve mayaların

gelişimi daha etkilidir [13, 18, 20, 23]. *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi depo küfleri %13-18 arasında neme sahip, su aktivitesi değeri en az 0.80 olan gıdalarda, deponun neminin ise %50-60'ın üzerine çıktığı ortamlarda kolay ürerler. *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un toksin sentezleyebilmeleri için depoda nem oranının %85 olması ve gıdanın neminin %17-19' a, su aktivitesinin 0.83- 0.87'e kadar yükselmesi gerekir [20].

**Sıcaklığın etkisi:** Doğada birçok mikroorganizmanın yaşamasında, kimyasal reaksiyonların ve aktivitelerin gerçekleşmesinde çok büyük rol onayan sıcaklık aynı şekilde küflerin üremesi ve gelişmesi üzerinde de etkilidir. Ayrıca sıcaklık mikotoksin sentezinde ve sentezlenen mikotoksinlerin türü üzerine de etkilidir. Toksinlerin gelişmesi için gerekli olan optimum sıcaklık 20–40°C'dir ve en iyi gelişme gösterdikleri sıcaklık ise 25–26°C arasındadır. Aflatoksinlerin ise en iyi gelişme gösterdikleri sıcaklık 24–35°C olmasına rağmen 5 ila 40°C arasında da üreyebilmektedir. Aflatoksin sentezleyen *Aspergillus*'lar 10 – 45 °C arası sıcaklıklarda ürer iken, 12 – 42 °C arası sıcaklıklarda toksin sentezlerler. Optimum gelişme sıcaklık dereceleri 35 – 38°C olup, en yüksek toksin konsantrasyonuna ise 25 – 30°C arası sıcaklıklarda ulaşılmaktadır [13, 18, 23]. *Aspergillus flavus*'un sentezlediği aflatoksin miktarları da sıcaklığa göre farklılık göstermektedir. *Aspergillus flavus* 20°C'de 15. günden, 30°C'de 11. günden sonra en yüksek miktarda aflatoksin sentezlemektedir. *Aspergillus*'lar içinde tek *Aspergillus ochraceus* diğer türlere göre daha düşük sıcaklıklarda üremekte ve okratoksin A sentezlemektedir [20]. Mikotoksin üremesini engellemek için gıda ve yemlerin bulunduğu ortamın sıcaklığını 10-15 °C arasında tutulmalı ve nemini de %13,5'in altına düşürülmelidir.

**Oksijen ve karbondioksitin etkisi:** Küfler aerobik canlılardır ve üremeleri ve toksin sentezleyebilmeleri için oksijene ihtiyaç duyarlar [18]. Ortamdaki oksijenin azaltılarak ya da karbondioksit miktarının artırılarak küflerin gelişmelerini önemli derecede değiştirilebilmektedir. Ortamdaki oksijen miktarı %1'in altına düşürülerek küf gelişimi azaltıldığı gibi toksin üretimi de azaltılır. Mantar türlerinin küf üretebilmeleri ve mikotoksin sentezleyebilmeleri için oksijene olan ihtiyaçlarında önemli farklar bulunabilir. *Aspergillus flavus*'un üremesinin ve sentezinin azaltılması için, ortamdaki oksijen miktarının %45'den %1'e düşürülmesi ya da karbondioksit miktarının %10'dan fazla olması gerekmektedir. Küflerin üremesi ve toksin

sentezlemeleri ortamdaki karbondioksit miktarının %20'nin üzerine çıkartılmasıyla değiştirilebilir. Oksijen ve karbondioksitin küfler üzerindeki bu etkilerinden faydalanılarak gıdaların ve yemlerin depolanma koşullarında bu özellikten yararlanılabilir [20].

**Besin çeşidinin ve yapısının etkisi:** Küfler üreyebilmek için organik karbonlara ve diğer enerji kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Ayrıca, küflerin üreyip toksin sentezleyebilmeleri için pepton, polipeptid ve aminoasitler gibi organik maddeleri azot kaynağı olarak kullanmaya ve kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), potasyum (K), demir (Fe), çinko (Zn), fosfor (P) gibi elementlere de ihtiyaçları vardır. Ayrıca yem maddelerinde küf bulaşmasının tarladan başladığı düşünüldüğünde, hasat sırasında fazlaca fiziksel hasar almış ürünler mantarların üremelerine ve toksin sentezleyebilmelerine ortam sağlamaktadır [13, 18, 20]. Bunları göz önüne alarak yem maddelerinin hasat sırasında daha dikkatli toplanmasıyla küflere karşı direnç artırılmalıdır.

**pH'nın etkisi:** Küflerin gelişebilmek için daha fazla asit ortamları tercih ettikleri, bununla beraber pH 1.5 - 8.5 arasında gelişebildikleri bilinmektedir. Aflatoksin üreticileri pH 2.5 - 6.0 arasında toksin oluştururlar, ancak yüksek miktardaki üretimi pH 5.0' den başlayarak daha yüksek pH' larda gerçekleştirirler [20, 24].

**Sürenin etkisi:** Küflerin gıda ve yem bitkilerinde gelişmesi, üreyerek mikotoksin sentezleyebilmeleri için belirli bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Depolama süresi ne kadar uzarsa o oranda küflerin üremesi ve mikotoksin sentezleri de artmaktadır. Küf sporlarını bulduran ürünlerde başta sıcaklık ve nem olmak üzere uygun koşulların sağlanması halinde 2 ile 4 gün içerisinde küfler gelişip üremekte ve insan sağlığını tehdit edecek miktarda mikotoksin sentezleyebilmektedirler. Aflatoksin miktarının dört katına çıkarabilmek için 16-24 günlük bir süreç yeterli olmaktadır [24].

**Diğer Etkiler:** Gıda ve besin maddelerinde meydana gelen mekanik hasarlar, ortamın bileşimi, ışık durumu, birden fazla küf türünün ortamda aynı anda bulunması gıda ve yemlerin hasat zamanı, iklim şartları ve havalandırma gibi unsurlar küf

gelişimini etkileyen faktörler arasında yer alır. Tarlalarda tahıllar ve bitkisel ürünler dışında kabuk veya tohum kabuğuyla çevrili olduklarından dolayı ve bunun haricinde dış kabuklarındaki eter yapısı içeren yağlar ile antibiyotik etkili maddelerin bulunmasıyla beraber fitositlerin de etkisiyle küflenmelere karşı koruma altındadır. Fakat hasat esnasında veya daha sonraki işlemler esnasında çizilerek, parçalanarak, ezilerek, kırılarak mekanik hasara uğrarlar ve aynı zamanda bu işlemler sırasında küflerin etki edebilecekleri yüzeylerde genişlemiş olur. Bu tür hasara uğramış ürünlerde küflerin üremesi ve toksin sentezlemeleri daha kolay olur. Ürünlerin tarladan zamanında hasat edilmemesi, havanın yağışlı ve nemli olması, depolarda gıdaların yeterli miktarda ışık alamaması, havalandırmasının yetersiz olması gibi durumlar da küflerin üremesinde etkilidirler [20, 23].

## 2.2. Aflatoksinler

Aflatoksinler, sıcak ve rutubetli ortamda bulunan gıda ve yemlerde bazı küf türleri tarafından doğal olarak sentezlenen mikotoksinlerdir ve mikotoksinler içerisinde en önemli grubu oluştururlar [25, 26].

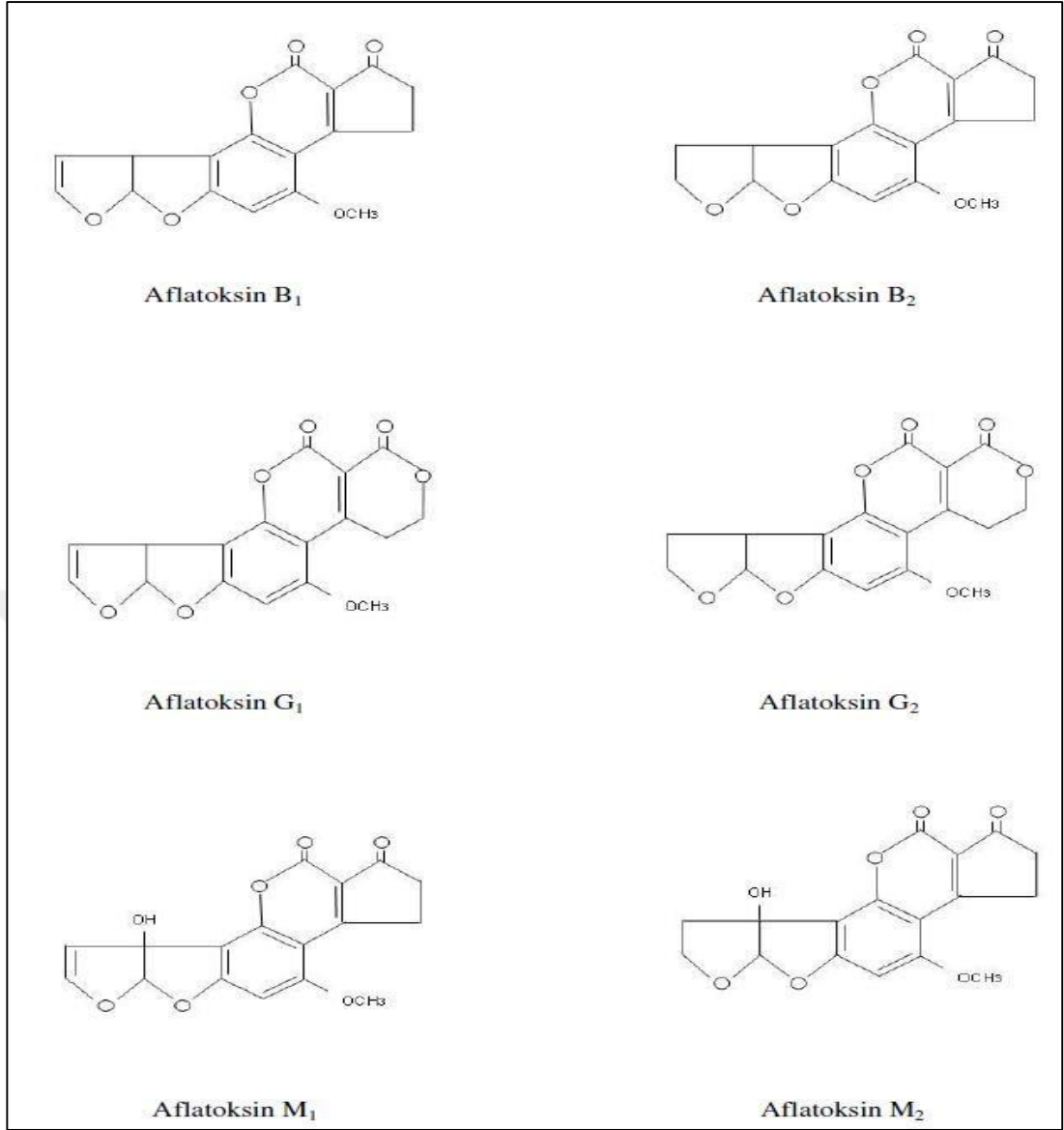


Şekil 2.1. *Aspergillus parasiticus*'un elektron mikroskopundaki görüntüsü [24]

Aflatoksinler insanlar ve hayvanlar için toksik etki yaratmaktadır. Her çeşit gıda ve yem maddesinde ise kirlenmelere neden olmaktadır. Birincil kanserojen etkiliye sebep olmaktadır. Ayrıca aflatoksinle kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünlerin insanlar tarafından tüketilmesi toplum sağlığını tehdit etmektedir. Bu sebeplerden dolayı aflatoksinler ilk tespit edildiği 1960 yılından günümüze kadar yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* gibi küflerin çeşitli tahıl ürünüde yetiştirilme, hasat ve depolanma aşamalarında ortam ısısına ve nemine bağlı olarak yerleşip üremesiyle oluşan toksik metabolitleridir. Küflerin ürettiği aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1 ve M2 bu grubun en önemli toksinleridir. Ayrıca kültür ortamında ve vücutta metabolit olarak şekillenenlerle birlikte bu toksinlerin sayıları 20'nin üstündedir. Bu toksinlerin isimlendirmeleri, aflatoksinlerin UV ışık altında yaydıkları floresan ışığın rengi esas alınarak düzenlenmiştir. UV ışık altında mavi floresan ışık verenlere İngilizce mavi anlamında gelen blue isminin baş harfi "B", yeşil floresan verenlere ise yeşil anlamına gelen green kelimesinin baş harfi olan "G" verilmiştir. Ayrıca süt ile vücuttan atılan türüne ise İngilizce süt anlamına gelen milk kelimesinin baş harfi olan "M" verilmiştir. AFB1 ve AFB2'nin sütteki metabolitleri ise AFM1 ve AFM2'dir. Metabolitler içerisinde en toksik olanı ise Aflatoksin B1'dir (AFB1) [19, 26]. Bazı önemli aflatoksin bileşiklerinden olan Aflatoksin B1, B2, G1, G2, M1 ve M2'nin kimyasal yapıları Şekil 2'de verilmiştir.





**Şekil 2.2.** Bazı aflatoksinlerin kimyasal yapıları [ 27, 28]

Aflatoxin M1 (AFM1), Aflatoxin B1 (AFB1) ile kontamine olmuş yemleri tüketen laktasyondaki hayvanların karaciğerinde AFB1'in biyotransformasyonu sonucunda meydana gelen metabolittir. AFM1 hayvanların meme bezlerinden süte geçmektedir. Böylece süt ve süt ürünlerinde AFM1'in var olması süt ürünlerini tüketenler açısından oldukça önemli sağlık problemlerine neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı birçok ülke insanların AFM1'le kontamine olmuş ürünlerin tüketilmesini en aza indirmek için çok çeşitli araştırma ve kontrol programları uygulamaktadır. Ülkeler kendi kriterlerini belirleyerek yemlerde kabul görülen AFB1 düzeyine sınırlama getirmiştir. Bunun üzerine süt ve süt ürünlerinde, bulunabilecek

maksimum AFM1 düzeylerini belirlemiştir. Türkiye'de de AFM1 ile ilgili çalışmalar yapılmış, süt ve süt ürünlerinde insan sağlığı için tehlike oluşturacak düzeyler belirlenerek rapor edilmiştir [29]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sütte maksimum aflatoksin M1 miktarının 0.5 ppb (0.25 ppb bebek gıdalarında) olarak belirtmiştir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Çin'de bu değerler kabul edilmiştir [30]. Avrupa Birliği'nde ise 0.05 ppb (0.025 ppb bebek gıdalarında) maksimum limit olarak kabul edilmektedir [31, 32].

**Tablo 2.1.** Türkiye'de Gıdalarda Bulunmasına İzin Verilen Aflatoksin Düzeyleri ( $\mu\text{kg}^{-1}$ ) (TGK, 2009) (Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan ürünler)

No	GIDA MADDELERİ	B1	Toplam (B1+B2+G1+G2)	M1
1	Yerfıstığı	8	15	-
2	Fındık, Antep fıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yerfıstığı	5	10	-
3	Fındık, Antep fıstığı gibi sert kabuklu meyveler	2	4	-
4	Kuru meyveler	5	10	-
5	Kuru meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri	2	4	-
6	Tüm tahıllar ve bunlardan üretilen ürünler (7, 10, 12'de listelenen gıdalar hariç)	2	4	-
7	Mısır	5	10	-
8	Çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0.050
9	Baharatların aşağıdaki türleri için; - Kırmızıbiber ( <i>Capsicum</i> spp.) (Bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızı biberin bütün ve toz hali dahil) - Karabiber ( <i>Piper</i> spp.) (Bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) - Hindistan cevizi ( <i>Myristica fragrans</i> ) - Zencefil ( <i>Zingiber officinale</i> ) - Zerdeçal ( <i>Curcuma longa</i> )	5	10	-
10	Tahıl bazlı işlenmiş gıdalar, bebek ve küçük çocuk gıdaları	0.1	-	-
11	Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0.025
12	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0.1	-	0.025

### 2.2.1. Aflatoksinlerin Toksisitesi

Mikotoksinler insanlara, küflü yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünlerin tüketilmesi ile geçmektedir. Mikotoksinler vücuda genellikle mikotoksinlerin metabolitleriyle kontamine olmuş gıdaların tüketilmesiyle alınmaktadır. Ayrıca mikotoksine maruz kalma yollarından bir diğeri ise mikotoksinlerin toksijenik sporlarının inhalasyonu ve doğrudan deri ile temasıdır [10]. Dünyanın çeşitli bölgelerinde insanların, aflatoksin günlük alım miktarları 0–30.000 ng.kg<sup>-1</sup> arasında değişmektedir [33]. İnsanlar beslenmelerinde düşük miktarda da olsa toksine maruz kalabilmektedir. Uzun vadede aflatoksinin vücuda düşük dozlarda da olsa alınması çok tehlikeli sonuçlara neden olabilmektedir [34]. Aflatoksinlerin toksisite derecesini ise kişinin aflatoksine maruz kalma durumu, kişinin beslenme alışkanlığı, yaşı ve bazı sağlık problemleri etkilemektedir [35].

İnsanlar ve hayvanlarda aflatoksinlerin oluşturduğu akut ve kronik seyirli mikotoksikoza aflatoksikoz adı verilmektedir [35]. Ayrıca aflatoksinlerin kronik gastrit, siroz, hepatit, Reye sendromu ve böbrek hastalıklarına neden olabildiği de belirtilmektedir [36]. Bununla birlikte aflatoksinlerin çocuklarda Kwashiorkor hastalığı ile ilgili olduğu da söylenmektedir [37]. Ayrıca mikotoksinler hayvanlarda ağırlık artışında azalma, verim kaybı, protein ve vitamin metabolizması bozukluğu, immunosupresyon ve kanser oluşumuna neden olmakla birlikte aflatoksin bulaşmış yemlerle beslenen hayvanlarda zehirlenmeler de görülmektedir.

Aflatoksinler oluşturdukları toksinlerin etki gücüne göre AFB1>AFG1>AFB2>AFG2 şeklinde sıralanmaktadır. Bu toksinler içerisinde AFB1'in insan sağlığı açısından en yaygın toksik olduğu belirtilmektedir [11, 36]. Aflatoksinler akut ve kronik toksisiteye ve büyük bir bölümü de karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkiye sahiptir [38]. Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (International Agency of Research on Cancer- IARC) tarafından AFB1 Grup 1 karsinojen, AFM1 ise Grup 2 karsinojen olarak belirtilmiştir. AFB1'in toksik ve karsinojenik etkileri karaciğer ve böbreklerde olduğu görülmektedir. Aflatoksinin hepatotoksik, hepatokarsinojenik ve teratojenik etkileri farklı hayvan türlerinde görülmüştür [23, 39]. AFB1'in malignant tümör oluşumunu tetiklediği bazı hayvanlar şu şekildedir; fare, maymun, ördek, lepistes, somon, alabalık ve kır faresi vs.dir. Bu bileşiklerin etki ettiği organ karaciğerdir. Bazı farelerde ise bu durumun haricinde

böbrek ve intestinal tümörler de görülebilmektedir [40]. Mikotoksin zehirlenmelerinin halen günümüzde etkin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Hatta besinlerden mikotoksinlerin tamamen temizlenmesi de mümkün değildir. Bundan dolayı insan sağlığı için kontamine gıdalar tüketilmemelidir ve gıdaların kontaminasyonuna karşı etkileyici önlemlerin alınması son derece önem teşkil etmektedir [23].

### **2.2.2. Aflatoksin M1**

Aflatoksin M1 (AFM1), karaciğerde biyo-transforme olmuş ve AFB1 kontamine olmuş gıda ile beslenen, emziren insan ve hayvanların meme bezleri tarafından üretilen süte salgılanan AFB1'in temel hidroksile metabolitini temsil eder. AFM1'in pastörizasyon ve ultra yüksek sıcaklıkta ısıtma (UHT) gibi süt işleme teknolojilerine ve diğer süt ürünleri işleme yöntemlerine karşı yüksek stabilitesi nedeniyle, bu mikotoksin sadece sütte değil, aynı zamanda süt ürünlerinde de bulunur. Hatta süt ürünlerinde bulunan AFM1, çiğ sütte bulunandan daha yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Çünkü yarı kutupsal özelliklerinden dolayı, AFM1 sütte bulunan fosfoprotein olan kazeine %80 oranında bağlanmaktadır. Ayrıca elde edilen üründe sütteki su oranının azalması ve süt proteinlerin elde edilen üründe fazla olmasından dolayı AFM1 konsantrasyonu süt ürünlerinde daha fazla bulunmaktadır [41, 42].

Proteinler, vitaminler, mineraller ve yağ asitleri içeren süt, özellikle bebekler ve çocuklar için en yaygın besin maddesi olduğundan, süt ve süt ürünlerinde AFM1'in varlığı önemli bir sağlık riski faktörüdür. AFM1'in insan anne sütü, süt ve süt ürünlerinde ortaya çıkması, özellikle bebekler ve küçük çocuklar için gerçek bir halk sağlığı sorunudur. Bebeklerin anne sütü alımıyla AFM1 kontaminasyonuna, bebek sütü formülü kullandıktan daha fazla maruz kaldıkları düşünülmektedir. Çünkü bebek sütü formüllerinde üretim aşamasında aflatoksin düzeyine bakılırken, anne sütünde aflatoksin tespitinin yapılması çok zordur. Bu nedenle, bebek sütü formülündeki maksimum AFM1 seviyesi Avrupa Komisyonu Tüzüğü (AB 165/2010) tarafından 0,025 µg / kg olarak belirlenmiştir, ancak insan anne sütündeki AFM1 varlığı henüz sınırlı değildir [41, 42]. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Çin, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlediği sütte bulunabilecek maksimum aflatoksin M1 miktarı olan 0.5 ppb (0.25 ppb bebek gıdalarında ise) değerlerini kabul edilmiştir [30].

AFM1'in emziren memelilerin sütünde 12 saat sonra tespit edilebildiği, konsantrasyonun bir tepe noktası olan AFB1 ile kirlenmiş gıdaların yutulmasından 24 saat sonra ortaya çıktığı görülmüştür. AFB1 ile kontamine gıda alımını durdurmasından 72 saat sonra, AFM1 konsantrasyonunun saptanamayan seviyelere düştüğü görülmüştür [42,43].

AFM1'in AFB1'den daha az mutajenik ve kanserojen olduğu düşünülse bile, sitotoksitesi, insan karaciğer mikrozomları ve insan sitokrom P450 enzimlerini eksprese eden veya eksprese etmeyen insan hücre çizgisi kullanılarak in vitro incelenmiştir. Bu deneyler, AFB1'e kıyasla, metabolik aktivasyonun yokluğunda, AFM1'in yüksek toksik potansiyelini göstermiştir. Bu nedenle, AFM1'in toksik etkisi göz önüne alındığında, DNA hasarı indükleyici gen mutasyonu, kromozomal anomaliler ve hücre transformasyonu sayesinde, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı 2002 yılında bu aflatoksinin Sınıf 2'yi Grup 2B'den Grup 1'e değiştirmiştir [42].

### **2.2.3. Çeşitli Teknolojik İşlemlerin Aflatoksin M1 Üzerindeki Etkileri**

Aflatoksinler yüksek molekül ağırlığına sahip, saf halde renksiz ve kristal formdadırlar. UV ışık altında ise güçlü floresan verirler. Kaynama noktaları yüksek olduğu için 200<sup>0</sup>C'nin üzerindeki sıcaklıklarda parçalanabilirler.

Isıl işlem ve kurutmanın AFM1'in stabilitesi üzerindeki etkisini belirlemek için; AFM1 ile kontamine olmuş sütlerde yapılan çalışmalar sonucunda sütte mevcut olan toksini azaltmada herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada ise AFB1'in kontamine olduğu yemleri tüketen ineklerden elde edilen sütlerde pastörizasyon, sterilizasyon ve evaporasyon işlemi uygulanmış ve yapılan analizler sonucunda, sütlerdeki AFM1 konsantrasyonunda azalma gözlemlenmiş ve daha yüksek ısıl işlemlerde ise AFM1 seviyesinde pek fazla bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

Bununla birlikte doğal ve yapay olarak kontamine olmuş sütlerde pastörizasyon işleminin AFM1'in stabilitesi üzerine etkisini belirlemek için yapılan başka bir çalışmada ise süt örneklerine yapay olarak kontamine edilen AFM1'in doğal olarak kontamine edilen örneklere göre daha fazla kayıp olduğu gözlemlenmiştir [42].

#### 2.2.4. Aflatoksin Tayininde Kullanılan Yöntemler ve Önemi

Aflatoksinler, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli mikotoksinler olduğundan gıda ve yemlerde miktarlarının belirlenmesi için çeşitli kromatografik ve immunokimyasal metodlar kullanılmaktadır.

Tüm aflatoksin tayinlerinde genel olarak içerisinde bulunan toksini, bulunduğu kompleks yapı içerisinde ekstre ederek aflatoksinle etkileşim yapabilecek maddelerin uzaklaştırılması için saflaştırma yapıldıktan sonra tayin edilmesi söz konusudur. Günümüzde, ince tabaka kromatografisi (TLC), sıvı kromatografisi (LC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) en çok kullanılan aflatoksin ayırma yöntemleri arasında yer almaktadır. Kromatografik yöntemlerle ayırma işlemi gerçekleştirildikten sonra UV adsorpsiyonu, kütle spektrofotometresi, floresans ölçümü ya da amperometrik tayin yöntemleri kullanılarak analiz yapılmaktadır. Floresans tayini yöntemi ile UV yöntemine göre 30-40 kez daha hassas ölçümler elde edilmektedir. Böylelikle 3-11 ng/g hassasiyete kadar tekrarlanabilir analizler yapılabilmektedir. Floresan tayini esasına dayanarak yapılan çalışmalarda siklodekstrinlerin işaretleyici olarak işleme katılmasıyla daha hassas sonuçlar elde edilmiştir. Tayin esnasında ise elektrokimyasal dedektör kullanımı yine yüksek hassasiyeti ve seçiciliği nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak, bu teknikler herkes tarafından kullanılamamaktadır. Bu yöntemi kullanabilmek için belirli bir uzmanlık ve yüksek yatırım maliyeti gerektirmektedir. Ayrıca analizi yapılacak maddenin ortamdan tam olarak ekstre edilememesinden kaynaklı sorun ise doğruluğu etkilemektedir [13, 18, 23, 42].

Aflatoksini saflaştırmak için kromatografik yöntemlerle birlikte “Aflatoksin Spesifik Antibadi” etkileşimlerinin kullanıldığı immünokimyasal tekniklerde kullanılabilir (Örneğin; ELISA, ICA vb.). Bu sistemler kullanılarak katı ve sıvı gıda ürünleri, vücut sıvıları, su ve toprak analizleri yapılabilmektedir [45]. Günümüzde daha da önem kazanan bu immünojenik yöntemlerin, radyoaktif işaretli antibadi kullanım zorluğu, antibadilerin tekrar kullanımın mümkün olmaması, kullanıcıya ekstra bir maliyet getirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Sonuç olarak, aflatoksin miktarının saptanmasında ileri düzeyde ekstaksiyon, saflaştırma gibi işlemlere gereksinim duymadan kısa sürede gerçekleştirilen analiz

yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde geleneksel aflatoksin tayinin zor olması ve belli bir uzmanlık gerektirmesi nedeniyle sadece ihracatı gerçekleştirilecek ürünlerde yapılmakta, iç piyasaya sunulan ürünlerin aflatoksin miktarlarıyla ilgili herhangi bir çalışma yapılmamaktadır. Bu yüzden, toksinin tayini amacıyla daha ucuz, hızlı ve basit test yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamız kapsamında aflatoksin tayini için alternatif bir yöntem olarak immünoensör hazırlanması hedeflenmiştir.

### **2.3. Biyosensörler**

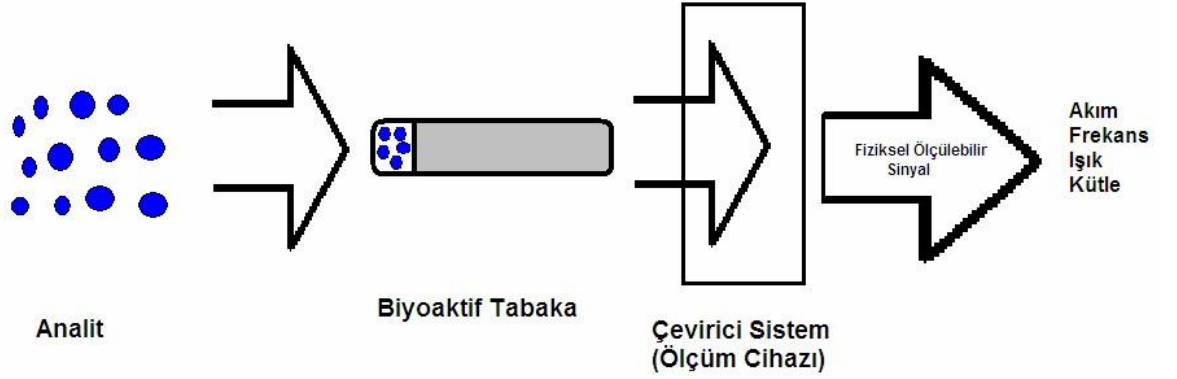
Günümüzde, gıda endüstrisi, klinik teşhisler, hijyen, çevre koruma, ilaç geliştirme veya adli tıp gibi alanlarda birçok farklı parametrenin izlenmesinin ve düzenlenmesinin önemi artmaktadır. Bu nedenle, hızlı ve doğru analizler yapabilen güvenilir analitik cihazların bulunmasına ihtiyaç vardır. Geleneksel yöntemlerin birçok dezavantajının üstesinden gelmenin yollarından biri uygun tasarlanmış biyosensör kullanmaktır [46].

Biyosensörler, kimyasal bileşikleri genellikle elektriksel, termal veya optik sinyallerle tespit etmek için izole edilmiş enzimler, immüno sistemler, dokular, organeller veya bütün hücrelerin aracılık ettiği spesifik biyokimyasal reaksiyonları kullanan bir cihazdır. Biyo-bileşenler olarak bir enzim, antikor, nükleik asit, lektin, hormon, hücre yapısı veya doku kullanılabilir. Rolü, hedef analit ile spesifik olarak etkileşime girmektir. Biyokimyasal reaksiyonun sonucunda ise dönüştürücü aracılığıyla ölçülebilir sinyal oluşturmaktır. İletken sistemler elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, termometrik, iyon duyarlı, manyetik veya akustik sistem olabilir. Biyosensör üretiminin en önemli kısmı, biyo-bileşenin immobilizasyonudur. Hareketsiz moleküllere sahip biyosensörlerin performansı ise kimyasal ve fiziksel koşullar (pH, sıcaklık ve kirlenici maddeler), malzemelerin kalınlığı ve stabilitesi gibi faktörlere de bağlıdır.

Biyosensörler hedef maddelerin biyolojik tepkimelerini denetlemek adına kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbirine entegre edilmiş, biri biyokimyasal diğeri ise elektrokimyasal özellikte iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analiz edilecek olan madde ile etkileşime girerek onu tanımadır.



Elektrokimyasal kısmın görevi ise bu tanıma işleminin sonucunda okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmektir [47].



Şekil 2.3. Biyosensör yapısı [48]

Biyosensör sistemleri, seçici tanıma mekanizmasına biyomolekül/biyojan, bu biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucunda oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştüren çevirici ve elektronik bölümler olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. En önemli bileşen ise tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir olarak etkileşime giren, duyarlı biyolojik ajandır.

Biyojanlar iki alt gruba ayrılırlar. Bunlar biyoafinite ve biyokatalitik ajanlardır. Biyoafinite ajanları antikorlar, hormon almaçları, DNA, lektin vb. moleküler antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılmaktadırlar. Biyokatalitik ajanlar ise analit üzerinde moleküler değişimlere sebep olur. Bu dönüşüm sonucunda ortamda azalmış ya da artmış olan madde miktarı izlenerek sonuca gidilebilir. Enzimler, mikroorganizmalar ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları bu amaçla kullanılmaktadır.

Enzimler genellikle biyosensörlerin gelişimi için biyomalzemeler olarak kullanılır. Bu biyosensörler, istenen moleküller için spesifik olan ve daha sonra yukarıda belirtilen transdüserlerden biri kullanılarak doğrudan belirlenen ürünün üretimini katalize eden enzimleri kullanır.

Piyasada bulunan en başarılı biyosensörler, glikoz oksidaz veya glikoz dehidrojenaz kullanan global biyosensör pazarının yaklaşık % 90'ını temsil eden kan numunelerindeki glikozu ölçmek içindir. Biyosensör yapımı için çeşitli enzimler kullanılmıştır. Örneğin laktat, malat, askorbat, amino asitler, alkol, kolesterol, gliserol, fruktoz, transferaz için oksidoredüktaz enzimleri kullanılmıştır. Birçok faktör, enzim bazlı biyosensörlerin performansına, bu tür bir enzim yüklemesine, uygun bir pH'ın, sıcaklığın ve bazı durumlarda bir kofaktörün, enzimin yeteneklerini muhafaza etmesine yardımcı olabilir. Elektrot performansını etkileyebilecek bir diğer faktör, enzimi tutmak için kullanılan immobilizasyon yönteminin türü ve sensör üzerindeki enzim katmanının kalınlığıdır [49, 50].

Bir antikor, oldukça sıralı bir düzende düzenlenmiş yüzlerce ayrı amino asitten oluşan karmaşık bir biyomoleküldür. Antijene özgü bir antikor, antijenine oldukça spesifik bir şekilde uyar. Antikorların bu eşsiz özelliği immünosensör kullanımları için çok önemlidir. Biyomoleküler etkileşimler, gerçekleştirilen test formatına göre (yani doğrudan ve dolaylı) iki kategoriye ayrılabilir. Doğrudan format, hareketsizleştirilmiş hedef molekül ile bir ligand molekülü arasındaki etkileşime veya hareketsizleştirilmiş ligand, doğrudan bir hedef molekülle etkileşime girmesine dayanır. İmmünosensörler için en temel durum, inkübasyonun ardından doğal floresan bir analitin doğrudan ölçülmesini içerir. Dolaylı immünosensörler, bağlanmadan sonra tespit edilen ayrı bir etiketli tür kullanılır. Bu durumda, etiketlenmemiş analit, sınırlı sayıda reseptör bağlanma bölgesi için etiketli analit ile bir rakip olarak hareket eder. Testin prensibi analit-etiket konjugatı antikor ile immünokompleks oluşturduğunda meydana gelen etiket sinyalinin değişmesine dayanır. Tahlil duyarlılığı azalan immobilize edilmiş reaktif ile artar. Reaksiyon bileşenleri numune ile karıştırılır ve cevap genellikle kinetik olarak ölçülür. Heterojen formatlar daha sık çalışılmaktadır, çünkü daha düşük saptama sınırlarına ulaşılmaktadır. Örneğin, ortak enzime bağlı katı faz immünoassay (ELISA) mikropalakalarda, tüplerde, kılcal damarlarda veya cam şeritlerde gerçekleştirilir ve etiketin ürettiği sinyali ölçmek için bir çeşit elektrokimyasal sensör bağlanır. İmmünosensörler, kanser hücrelerinin veya bunların belirleyicilerin tespit edilmesinin izlenmesi, bakteri ve virüs tespit deneyleri, toksinler vb. için tasarlanabilir [50,51, 52].

DNA, RNA ve peptid nükleik asidine dayalı biyosensörler, sıralı nükleotid iplikçiklerinin tamamlayıcı bölümleri arasındaki çok güçlü baz çifti afinitesinden yüksek hassasiyet ve seçicilik kazanırlar. Nükleik asit (NA) bazlı biyosensörler, biyolojik tanıma elemanı olarak bir nükleik asit (doğal ve biyomimetik oligo ve polinükleotit formları) içerir. Günümüzde, esas olarak sentetik oligodeoksiribonükleotitler (ODN'ler) DNA hibridizasyon sensörlerinde prob olarak kullanılmaktadır. ODN'leri transdüser yüzeylerine sabitlemek için tiyoller, disülfidler, aminler veya biyotin gibi uç etiketler dahil edilmiştir. Uzun esnek bir aralayıcı, genellikle yüzey tutturma için yeterli bir erişilebilirlik sağlamak için hidrokarbon bağlayıcılar vasıtasıyla eklenir. Baz çifti tanıma olayının ölçülebilir bir elektrik sinyaline dönüştürülmesine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, genetik hastalıkların hızlı ve ucuz teşhisi, klinik açıdan ilgi çekici patojenik biyolojik türlerin tespiti için uygun adaylar olarak kabul edilir ve mikrofabrikasyon teknolojisi ile uyumludur [53].

DNA molekülündeki bazların bilinen sekansı için, bir prob adı verilen tamamlayıcı sekans sentezlenebilir ve daha sonra optik olarak saptanabilir bir bileşik ile etiketlenebilir. Etiketli prob, çift iplikçikli DNA tek iplikçiklere çözüldükten sonra hedef molekül üzerindeki tamamlayıcı dizisine hibridize olur, daha sonra prob eklenir ve böylece iplikçikler tamamlanır. Çift yönlü oluşum, hedefin beklenen nükleotid dizisine sahip olduğuna dair kanıt olarak düşünülebilir. Hibridizasyon olayı olarak adlandırılan bir DNA dupleks oluşumunun elektrokimyasal tespiti, nükleik asit elektroaktivitesi, hedefin etiketlenmesi veya kovalent olarak bağlanmış elektroaktif türlerle (örn. Nanoparçacıklar) etiketlenmesi veya çeşitli şekillerde değişiklikler nedeniyle elektrokimyasal sinyallerine dayanır [53, 54, 55].

Biyoreseptör olarak hücreler, ya bütün bir hücre / mikroorganizma ya da belirli türlere spesifik olarak bağlanabilen spesifik bir hücresel bileşen tarafından biyolojik olarak tanınmaya dayanmaktadır. Bu biyoreseptörler sınıfının kullanılmasından kaynaklanan en büyük avantajlardan biri, sinyal sınırlaması nedeniyle tespit sınırlarının çok düşük olmasıdır. Bu tip biyoreseptörlerle geliştirilen birçok biyosensör, katalitik veya psödokatalitik özelliklerine dayanır. Örneğin, mikrobiyal biyosensörler durumunda, canlı veya canlı olmayan mikrobiyal hücreler kullanılır. Geçirgenleştirmeden sonra elde edilen canlı olmayan hücreler veya periplazmik

enzimler içeren bütün hücreler, enzimler için daha ucuz bir alternatif olarak kullanılmıştır. Canlı hücreler hücrenin solunum ve metabolik fonksiyonlarını kullanır. Böylece analit, bu işlemlerin bir substratı veya bir inhibitörü olarak izlenebilir. Hücre bazlı biyosensörlerin (CBB'ler) belirli agonistler için duyarlılığı, reseptör-ligand kombinasyon sabiti ile çıkarılabilir. Farmasötik bileşiğin belirli bir fizyolojik sistem üzerindeki etkisini analiz etmek için hücre bazlı biyosensörlerle uygulanabilir. Canlı hücrelerin, ana hücrelerin seçimi, kültürü ve bakımı da dahil olmak üzere birincil biyosensör olarak değerlendirilmesinde birçok karmaşık engel vardır. Canlı hücrelerin ve ikincil sensörün birleşmesi zorluklardan birini temsil eder. Öte yandan, hücre bazlı biyosensörler, dinamik ve hızlı bir şekilde gerçek zamanlı biyo-tahliller yapabilir. Örneğin patojenlerin, toksinlerin veya ajan sınıflandırmalarının tespiti için çok sayıda uygulamaya sahiptir [56, 57, 58].

Dönüştürücüler (transdüser), giriş miktarı ile belirli bir ilişkiye sahip olan bir çıkış miktarı sağlayan analitik bir araçtır. Biyosensörler, kullandıkları transdüksiyon yöntemlerine göre sınıflandırılabilir. Çoğu transdüksiyon formları beş ana sınıftan birinde sınıflandırılabilir: elektrokimyasal, elektriksel, optik, piezoelektrik (kütle algılama yöntemleri) ve termal algılama.

Elektrokimyasal biyosensör sınıfı için temel prensip, hareketsiz biyomolekül ile hedef analit arasındaki kimyasal reaksiyonların, çözeltinin ölçülebilir elektriksel özelliklerini, örneğin bir elektrik akımı veya potansiyelini etkileyen iyonları veya elektronları üretmesi veya tüketmesidir.

İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

**Seçicilik:** Bir biyosensörün en önemli özelliği kendine has bir seçiciliğe sahip olmasıdır. Seçicilik özelliği az olan biyosensörlerde ise seçiciliği artırmak için ek prosedürler ilave edilmesi gerekir. Böylelikle yapılan işlemlerde daha duyarlı bir biyosensörle çalışma gerçekleştirilmiş olur.

**Kullanım Ömrü:** Biyosensör kullanım ömrünün belirlenmesinde biyolojik algı yüzey aktivitesinin azalması en etkili faktördür Bunun yanı sıra kalibrasyon sıklığı, tekrarlanabilirlik, stabilite gibi parametreleri de kullanım ömründen etkilenir.

**Kalibrasyon Gereksinmesi:** İdeal bir biyosensörde kalibrasyona hiç gerek duyulmaması gerekir ya da bu kalibrasyonun en az düzeylerde olması gerekmektedir. Fakat bu özellik, teoride planladığı gibi pratikte gerçekleştirilememiştir. Biyosensörler kullanıldığı müddetçe sık aralıklarda kalibre edilmesi gerekmektedir.

**Tekrarlanabilirlik:** İdeal bir biyosensörde elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerin sonuçları hemen hemen aynı olması ya da birbirine çok yakın değerler olması beklenmektedir. Pratikte bu durum pek mümkün olmasa da yinede yapılan çalışmalarda, bu durumu göz önünde bulundurarak mutlaka çalışmaların tekrarlanabilirlik parametresi incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik düzeyinin fazla olmasına paralel olarak biyosensör uygulamaları da daha etkili olur.

**Stabilite:** İdeal bir biyosensörde, elektrot stabilitesinin yani kararlılığının yüksek olması gerekmektedir. Elektrotun kararlılığı, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Bununla birlikte pH, nem, ısı, ortamın O<sub>2</sub> konsantrasyonu gibi unsurlardan da etkilenmektedir.

**Yüksek Duyarlılık:** Bir biyosensörü ideal yapan diğer bir unsur ise, biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin sadece belirli maddelere karşı duyarlı olmasıdır.

**Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı:** Bir biyosensör tasarımında tayin sınırı, belirli bir konsantrasyonun altında olmalıdır. Bu tayin sınırı elektrot yüzeyi büyüklüğüne, biyolojik maddenin afinitesine ve immobilize edilen madde miktarına bağlıdır.

**Geniş Ölçüm Aralığı:** Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım-konsantrasyon eğrilerinin lineer olduğu konsantrasyon aralığına söylenmektedir.

**Hızlı Cevap Zamanı:** Biyosensörlerin cevap zamanları, akım-zaman eğrilerine göre yorumlanmaktadır. Elde edilen akım-zaman eğrilerinin geniş ve yayvan olması cevap zamanının uzun olduğunu gösterirken, eğrilerin dar oluşu cevap

zamanının kısa olduğunu göstermektedir. Diğer bir ifadeyle cevap zamanının hızlı olması, eğrilerin dar olmasına bağlıdır.

**Hızlı Geriye Dönme Zamanı:** Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin de ölçülebileceğini belirler. Diğer bir ifadeyle ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa süre sonra gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

**Basitlik ve Ucuzluk:** Bir biyosensörün tasarımının basit, ucuz ve kullanımı rahat olmalıdır. Bundan dolayı yapılmış olan ilk biyosensörlerdeki karmaşıklık ve maliyetli olan biyosensörler daha sonra basitleştirilerek, maliyeti de mümkün olduğu kadar azaltılmıştır.

**Küçültülebilirlik ve Sterilize edilebilirlik:** Biyosensör tasarımında elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi önemlidir. Bununla birlikte biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir [47].

Biyosensörlerin sınıflandırılması biyosensör bileşenleri temel alınarak,

- Algılama bölümüne göre,
- Fiziksel çevirici bölümün türüne göre gerçekleştirilir.

### **2.3.5. Algılama (Biyokimyasal) Kısımına Göre Biyosensörler:**

Biyosensör sistemini oluşturan bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli bir şekilde etkileşime giren, biyomolekül kısmıdır. Bu kısım sayesinde biyosensör, tayini yapılacak biyomolekülü tanıyarak etkileşime girer. Enzimler, mikroorganizmalar, hücreler, organeller, antikorlar, nükleik asitler ve aptamerler bu biyomoleküllere örnek olarak gösterilebilirler.

#### **2.3.5.1. Enzimatik Biyosensörler**

Biyoreseptör olarak kullanılan biyomoleküller olan enzimler, kimyasal tepkimeler sonucunda proton, elektron, ışık ve ısı gibi çeşitli ölçümlenebilir ürünler

oluşturmaktadırlar. Özellikle fazla sayıda alt birime sahip allosterik enzimlerin yapıları gereğince biyosensör molekül olarak önemli potansiyellerinin bulunduğu belirtilmektedir. Tipik olarak kullanılan biyo-element olan enzimler büyük protein molekülleridir. Bunlar kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve reaksiyon sonunda hiçbir değişikliğe uğramadan reaksiyonu terk eden makromoleküllerdir [50, 59,60].

### **2.3.5.2. Nükleik Asit Biyosensörleri**

Nükleik asitlerin biyoreseptör olarak kullanıldığı biyosensörler “genosensör” olarak adlandırılmaktadır. Bir genosensörün çalışma prensibi birbirinin tamamlayıcısı olan iki tane tek iplikçikli DNA (ssDNA) zincirinin birbirlerine oldukça spesifik şekilde bağlanarak çift iplikçikli DNA (dsDNA) oluşturması işlemine dayanmaktadır. Bu oldukça spesifik bağlanma işlemine DNA hibridizasyonu denir. Bir genosensör bileşeni olarak kullanılan ssDNA zinciri prob olarak adlandırılmaktadır. Probon eşleniği olan ve analizlenecek numunede bulunması durumunda sensör yüzeyinde hibridizasyonun oluşacağı DNA dizisine ise hedef dizi denir. Genosensörler; tayin edilmek istenen herhangi bir hastalığı, kalıtsal bir davranışı ya da bakteri ve virüslerinin patojenitesini simgeleyen bir prob DNA dizisinin, hibridizasyon sonucu bu diziye karşılık gelen hedef diziyi oluşturduğu çift sarmalın biyokimyasal yapısı tanıma olayını mümkün kılmaktadır. Çevirici kısım olarak elektrokimyasal çeviricileri kullanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, kalıtsal, viral ve bakteriyel hastalıkların tanısında kullanılan rutin analiz yöntemlerine alternatif olarak daha hızlı, ucuz ve kolay bir yöntemdir [48, 50].

DNA biyosensörleri kirletici ajanların ya da metallerin, genetik modifiye gıdalar ve organizmaların, DNA-ilaç etkileşim mekanizmalarının, biyoterörizm, hastalıkların teşhisi, DNA baz hasarının ve insan, virüs ya da bakterilerde spesifik DNA dizisinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

### **2.3.5.3. Mikrobiyal Biyosensörler**

Mikroorganizmalar, amperometrik, potansiyometrik, kalorimetrik, kondüktometrik, kolorimetrik, lüminesans ve flouresans gibi çeşitli transduserler (dönüştürücüler) ile entegre edilerek farklı biyosensörler elde edilebilir. Biyosensörlerde kullanılan enzimler substratları veya inhibitörleri için seçimli olsa da zaman zaman sinyal oluşturabilmek için kofaktör/koenzimlere ihtiyaç duymaktadırlar.



Mikroorganizmalar duyarlılık amaçları için sinyal olarak kullanılabilen çok sayıda kimyasala yanıt verme yeteneği gösteren sayısız enzim, kofaktör/koenzim içeren bir fabrikaya benzetilebilir. Bu bağlamda mikroorganizmalar enzimlere ideal bir alternatif sağlamaktadırlar.

Mikrobiyal biyosensörlerde biyokomponent olarak *Saccharomyces Cerevisiae* kullanmanın avantajlarına bakacak olursak: Algılayıcı element olarak bütünleşmiş hücrelerin kullanılması saf enzimlerin kullanımından daha avantajlıdır ve genellikle hücre içinde bulunan enzimler izole edilenlerden daha kararlı halde bulunur. Birçok bütünleşmiş hücre biyosensörleri bakteri hücrelerine dayanarak yapılmaktadır. Ancak sensör ortamında dayanıksız olmaları, belirli türlerin sınırlı pH, sıcaklık vb. özelliklerinden dolayı bakterilerin kullanılması dezavantaj olmaktadır. Mayalar bakterilere göre daha dayanıklıdır, bakteriler gibi hızlı gelişir, kolaylıkla manipüle edilebilir ve geniş aralıkta substratlara adapte edilebilir [50, 59, 60].

#### **2.3.5.4. İmmunosensörler**

İmmunosensörler, tanıma elemanı olarak antikorları kullanan biyosensörlerdir. Bir transdüser yüzeyindeki bir antikor ile antijen arasındaki etkileşimlere dayanmaktadır. Antikor veya antijen transdüser üzerinde herhangi biri hareketsizleştirilerek oluşturulur. Tüm immunosensörlerin asıl temeli, stabil bir kompleks oluşturmak için antijenlerin moleküler olarak tanınmasının spesifikliğidir. Bu biyomoleküller arasındaki güçlü bağlanmanın olmasıyla immunosensörler yüksek seçicilik ve çok yüksek hassasiyet göstermekte ve farklı bilim alanlarındaki birçok uygulama için de onları çekici kılmaktadır [50, 60].

Geleneksel immünolojik testler, güvenilir analitik sonuçlar elde etmek için beceri ve zaman gerektirir. İmmunosensörler, bilim insanlarına ve klinisyenlere, çeşitli konsantrasyonlarda karmaşık karışımlarda çeşitli analitlerin kesin ölçümlerini sağlamanın bir yoludur. Diğer immünolojik testlere kıyasla avantajları, çok sayıda adımda çeşitli reaktifleri doğru şekilde pipetlemek zorunda olmama kolaylığı, bir portatif ünite tasarlama imkanı, aynı anda birden fazla analit ölçüm kabiliyeti ve numune toplama ve elde etme arasındaki zamanın azalmasıdır.

İmmünoansörler, bir numunede bulunan antikor, antijen veya hapten miktarını ölçmek için moleküler tanıma sistemlerinin oldukça seçici yapılarına güvenirlir. Antikorlar, antijenlere karşılık olarak vücut tarafından üretilen immünooglobulinlerdir. Bir antijen, vücut tarafından yabancı olarak tanınan ve bir immün tepkisi tetikleyen herhangi bir moleküler türdür. Antikorlar, genellikle biyolojik tanıma elemanı olarak seçilmektedir, çünkü girişimcilerin mevcudiyetinde uygun analiti tanımlarına izin veren yüksek bir spesifikliğe sahiptir.

İmmünoansör teknolojisinin ortaya çıkış kaynağı klasik immünotest (immünoassay)'dir. İmmünoansörler uygulanan tespit prensibine göre kategorize edilebilir. Ana gelişmeler elektrokimyasal, optik ve mikrogravimetrik immünoansörlerdir. İmmünoassay'in aksine, modern dönüştürücü teknolojisi, immün kompleksin etiketsiz tespitini ve miktarını belirler. Antijen veya antikorların sensör yüzeyine immobilizasyonu ile üretilen immünoansörler, genellikle ölçüm prensibine göre sınıflandırılmaktadır. Elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik), optik, piezoelektrik, akustik ve termometrik duyarlı elementler immünoansörler için sensör basamakları olarak kullanılmaktadır. İmmünoansörler genellikle optik ya da elektrokimyasal esastır. Elektrokimyasal immünoansörlerde saptama işlemi genellikle elektroaktif işaretleyiciler kullanılarak ya da enzimlerin işaretlenmesi yöntemiyle yapılmıştır. Ölçüm prensibine göre sınıflandırılmış olan immünoansörler direkt ve indirekt olarak da sınıflandırılabilir [59,60, 61, 62].

Direkt immünoansörler, sinyalde fiziksel değişiklik oluşturan antikor-antijen kompleksi oluşturularak tasarlanmaktadır. İndirekt immünoansörlerde ise antikor ya da antijene konjuge edilen işaretleyicilere dayanılarak, bağlama olayı gözlemlenebilmektedir. İndirekt immünoansörlerde, bir immüno kompleks birçok değişik yolla oluşturulabilir. Ancak son adımda potansiyometrik, amperometrik veya optik ölçümlerle belirlenebilen bir işaretleyicinin olması gerekmektedir [59].

### **2.3.6. Çevirici Kısma Göre Biyosensörler**

#### **2.3.6.1. Optik Biyosensörler**

Optik biyosensörler alanı son birkaç yılda hızlı bir büyüme göstermiştir. Optik immünoansörler, absorpsiyon, rotasyon, kırılma indisi, biyo / kemilüminesans ve floresans gibi optik özelliklerdeki değişikliklerle antijen-antikor bağlanmasını tespit

ederek işlev görür. Optik immüno-sensörler, diğer algılama platformlarında olduğu gibi doğrudan veya dolaylı olarak tanımlanabilir. Doğrudan sistemler, ölçülen sinyali modüle etmek için yalnızca antijen-antikor bağlanmasına dayanırken dolaylı sensörler, bağlanma olayını görselleştirmek için etiketlerin kullanımına bağlıdır. Doğrudan tipin avantajı, tahlilin tespit için ek bir maddeye ihtiyaç duyulmaması nedeniyle esasen “reaktifsiz” olmasıdır. Dezavantajları, duyarlılığın spesifik olmayan bağlanma ile sınırlı olabileceği ve analit boyutunun standart test formatlarının kullanımını sınırlayabileceğidir. Dolaylı format, etikete bağlı olarak azalan bir miktarda spesifik olmayan bağlanma nedeniyle geliştirilmiş hassasiyet ve seçicilik avantajına sahiptir. Normal test formatları, dolaylı sensörlerle hala kullanılabilir, çünkü etiketler, transdüserle bağlı küçük moleküller için bile optik sensör tepkisini yükseltmeye hizmet edecektir. Dolaylı sensörlerin ana dezavantajı, etiketli reaktifler ek ihtiyaçtır [59, 60 61].

Optik biyosensör çeşitlerinden ticari olarak en çok kullanılanıdır. Optik biyosensörler patojen tayininde ve hastalıkların tespit edilmesinde önemli bir role sahiptir. SPR ticari olarak optik esaslı analiz sistemleri arasında en çok kullanılanıdır. BIAcore™ ise piyasadaki en büyük pazara sahiptir. Kullanım kolaylığından dolayı ve kullanımına alışılmış cihazlar olduğundan laboratuvar araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [62].

### **2.3.6.2. Piezoelektrik (Kütleye Dayalı) Biyosensörler**

Piezoelektrik kristallerin kullanıldığı kütle hassas sensörler, oluşan kütle değişimlerini nanogram/cm<sup>-2</sup> mertebelerinde algılayabilen cihazlardır. Kütle ölçümlerini rezonans frekanslarındaki sapmalara bağlı olarak ölçebilmektedirler. Piezoelektrik biyosensörler, temel olarak kristal yüzeyi üzerindeki kütle değişimi sonucu piezoelektrik kristalinin rezonant frekansındaki değişikliklerin ölçülmesi üzerine temellenmiştir (genellikle antikor-antijen reaksiyon veya bir DNA parçası ve bunun tamamlayıcı sırası gibi biyokimyasal etkileşim tarafından sebep olunur). İki ana tip piezoelektrik cihaz bulunmaktadır: kuartz kristal mikrobalaans (QCM, Quartz Crystal Microbalance) ve yüzey akustik dalga (SAW) cihazı.

Piezoelektriksel çeviriciler genellikle ağırlık değişim tespitinde kullanılmaktadır. Bu tür sensörlerin yararı etiketleme ihtiyacı olmamasıdır.

Piezoelektrik özellikli kristaller kullanılarak yapılan tasarlanan bu sensörler, alternatif akım uygulandığında titreşim oluşturmakta ve bu titreşim ölçülmektedir. Ayrıca piezoelektrik kristaller veya materyaller üzerine bir cisim konulduğunda bunların ürettiği titreşim değerleri değişmekte ve bu değişimler ölçülebilmektedir. Üzerine ağırlık konulduğunda bu sensör titreşimi azalmakta ve değerindeki değişim sayesinde kütle değişimi miktarı hesaplanabilmektedir [50].

Piezoelektrik biyosensörler, hastalıkların teşhisinde elektrokimyasal ve optik biyosensörlere göre daha az rağbet görmekte beraber, yiyecek ve çevre örneklerinde farklı patojenlerin tayininde kullanılmaktadır [50, 59, 60].

Piezoelektrik biyosensörler üzerine yapılan yoğun araştırmalar, bu sistemlerin biyokimyasal reaksiyonları tek adımda, düşük maliyetli olarak tespit etme potansiyelini göstermektedir[50, 59, 60].

#### **2.3.6.3. Termal (Kalorimetrik) Biyosensörler**

Termal biyosensörler, biyomoleküllerin sıcaklık sensörleri üzerine immobilizasyonu ile oluşturulur. Analit biyolojik bileşenle temas ettiğinde, analit derişimiyle orantılı olan reaksiyon ısı ölçülür. Üretilen veya emilen toplam ısı, molar entalpi ve reaksiyondaki toplam molekül sayısı ile orantılıdır. Sıcaklığın ölçümü bir termistör vasıtasıyla yapılır ve bu gibi cihazlara enzim termistörleri denir. Termal biyosensörler sık tekrar kalibrasyon gerektirmez ve numunenin optik ve elektrokimyasal özelliklerine duyarlıdır. Kalorimetrik biyosensörler gıda, kozmetik, ilaç ve diğer bileşen analizleri için kullanılmıştır [50, 59, 60].

#### **2.3.6.4. Elektrokimyasal Biyosensörler**

Literatürde son zamanlarda elektrokimyasal temelli sensör çalışmaları yaygındır. Elektrokimyasal immünosensörler, bir elektrokimyasal transdüktörde üretilen elektrik sinyalinin ölçümlerini keşfeder. Bu sinyal voltametrik, potansiyometrik, iletken ölçülü veya impedimetrik olabilir. Elektrokimyasal saptama kullanan immünosensörler, spesifik, basit, portatif ve genellikle tek kullanımlık olduklarından ve yerinde veya otomatik saptama gerçekleştirebildiklerinden, çeşitli analizlerde araştırılmıştır.

Elektrokimyasal immünosensörler, yüksek hassasiyet, kullanım kolaylığı, muhtemel bir otomasyon ve kompakt analitik cihazlara entegrasyon gibi özelliklere sahip olması, ucuz ve nispeten basit bir teknolojiye sahip olması gibi birçok özelliğinden dolayı son zamanlarda fazlaca ilgiyi üzerine çekmiştir. Bu nedenle, elektrokimyasal immünosensörlerin, hastalıkların erken teşhisi için bakım noktası (POC) teşhisi konusunda büyük potansiyeli vardır. Son yıllarda, elektrokimyasal immünosensörlerin geliştirilmesine yönelik çok fazla çalışma yapılmıştır. İlk olarak, yüksek hassasiyet elde etmek için farklı üretim yöntemleri ve büyütme stratejileri kullanılmıştır. Belirtilmek gerekirse, nanoteknoloji, elektrokimyasal immünosensörlerin üretilmesi ve sinyal yükseltilmesinde rol oynamaktadır ve bu da büyük üstünlük sağlamaktadır. İkinci olarak, elektrokimyasal immünosensörler dizileri multiparametrik analiz için kullanılmıştır [61, 63, 64].

Elektrokimyasal biyosensörler amperometrik, kondüktometrik, potansiyometrik, impedimetrik olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

- **Potansiyometrik Biyosensörler**

Bu tür immünosensörler ölçüm esnasında harcanan veya bozulan özel bir türün aktivite değişimiyle orantılı logaritmik olarak değişen potansiyelin ölçümü temeline dayanır. Böylelikle konsantrasyon farklanmaları ve bağımsız yanıtlardan kaynaklanan karmaşa bertaraf edilebilir [62].

Bu dönüştürücü, neredeyse sıfır akım akışında iki çözeltiyi ayıran iyon seçici membran boyunca üretilen potansiyeldeki farkı ölçer. Cam elektrotlar, metal oksit bazlı sensörler ve iyon seçici elektrotlar dahil olmak üzere tüm potansiyometrik sensörler ticari olarak temin edilebilir. Ayrıca, gelişmiş modern silikon veya kalın film teknolojileri kullanarak minyatür formatlarda kolayca seri üretilebilirler [50].

- **Amperometrik Biyosensörler**

Amperometrik biyosensörler bir substratın oksidasyon veya redüksiyonu sonucu oluşan akımı ölçer. Genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Amperometrik biyosensörlerdeki en önemli faktör biyokatalizatör ile elektrot veya varsa iletken polimer arasındaki elektron akışıdır. Bunu iletken polimerler en iyi şekilde başarırlar. Amperometrik biyosensör sistemlerine en uygun

enzimler oksidazlar, dehidrogenazlar yani oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir [59,61, 62].

Amperometrik immunosensörler belli bir potansiyelde gerçekleşen immünoreaksiyona ait elektrokimyasal reaksiyon sonucu oluşan akım farklanmalarını ölçen aletlerdir. Küçük miktarda analit kullanımına olanak tanır. Analit redoks aktif bir madde olmalıdır, eğer değilse redoks aktif bir türle işaretlenmelidir [65].

Amperometrik biyosensörler en yaygın biyosensör sınıfıdır. Amperometrik biyosensörler, seri üretim için potansiyometrik olanlardan çok daha hassastır ve daha uygundur. Çalışma elektrotu, genellikle bioelement tarafından kaplanan soylu bir metal veya serigrafik tabakadır [50].

- **İmpedimetrik Biyosensörler**

Elektrokimyasal analizlerde kullanılan impedimetrik yöntemler, analitin biyolojik molekülle reaksiyona girmesiyle, bu molekülün hedef analitle etkileşime girdiği durumlarda elektrokimyasal analiz sonucu meydana gelen sığa (kapasitans) ara yüzeylerdeki belirli bir potansiyel altında taşıyabileceği maksimum yük miktarını vermektedir. Aynı zamanda elektroliz sıvısı içerisinde bulunan elektrolit ile elektrot arasında oluşan ara yüzeylerdeki elektron transferlerindeki değişiklikleri göstermekte olan bir yöntemdir. Ara yüzeyde meydana gelen bu değişimlerde Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile incelenmektedir[66].

- **Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi**

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), elektrokimyasal sistemleri karakterize etmek için kullanılan bir tekniktir [67]. EIS verileri, difüzyon, reaksiyon oranları ve mikroyapısal özellikler dahil olmak üzere birçok temel fiziksel özellik ile ilişkilendirilebilir. [68].

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), enerji, elektrokataliz ve tıp gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan bir karakterizasyon tekniğidir. EIS verileri, difüzyon katsayıları ve kimyasal reaksiyon hızları gibi fiziksel özellikleri ve incelenen elektrokimyasal (EC) sistemin mikroyapısal özelliklerini elde etmek için kullanılabilir. Bir başka özelliği de bir EIS deneyinin uygulanması nispeten basittir.

EIS, tüm klasik elektrokimyasal teknikler arasında benzersizdir. Çünkü mevcut ve frekans alanındaki uygulamalı potansiyel farkı arasındaki ilişkiyi ölçmektedir. Spesifik olarak, EIS tekniği mevcut ve potansiyel arasındaki transfer fonksiyonunu tahmin etmektedir. EIS'i ölçmek için, bir elektrokimyasal sistemi verilen bir frekanslar kümesi için küçük (ideal olarak sonsuz) bir sinüzoidal gerilime (potansiyostatik mod) veya akım (galvanostatik mod) bozulmasına maruz kalmakta ve sonuçta ortaya çıkan sinüzoidal akım veya voltaj tepkisi kaydedilmektedir. Gerilim-akım genlik oranından ve giriş ve çıkış arasındaki faz gecikmesinden, biri, pertürbasyon frekansına  $f$  bağlı olan, karmaşık değerli bir  $Z(f)$  fonksiyonunu elde edillir. EIS'nin anlamlı olması için istikrar, doğrusallık ve nedensellik şartlarının yerine getirilmesi gerektiği belirtilmektedir. Birincisi, elektrokimyasal sisteminin kararlı olması gerekmektedir, çünkü zamanla değişirse  $Z(f)$  olacaktır. İkincisi, pertürbasyonun doğrusal olması çok önemlidir: Eğer uygulanan sinüzoidal pertürbasyonun genliği yeterince küçükse, yanıt aynı frekanstaki sinüzoid olacaktır. Bunun yerine,  $f$  frekansındaki sinüzoidal girişin genliği büyükse, ölçülen tepki,  $f$  frekanslarındaki sinüzoidlerin toplamı olacaktır;  $2f$ ;  $3f$ , vb. [69]. Üçüncü olarak nedensellik gereklidir: ölçülen akım (veya voltaj) uygulanan voltaj (veya akım) bozulmasının doğrudan sonucu olmalıdır.

EIS verilerini yorumlamak zor olabilir. Aslında, birçok pratik durumda, birden fazla model deneysel verilere eşit derecede uygun olabilir. Bu belirsizlikler daha da şiddetlenebilir, çünkü modellerin bazı parametreleri yeterli doğrulukta belirlenemeyebilir [70].

Elektrokimyasal empedans spektroskopisinin (EIS) (arayüzler bağlamında) ana rolü, elektrot / elektrolit arayüzleri üzerindeki çift katmanlı yapıların karakterizasyonudur; çift katmanlı kapasitansın ana konsepti bu incelemenin odağındadır. Buna göre, birinci bölüm, sulu ve iyonik sıvı (IL) elektrolitleriyle ilgili, çoğunlukla fenomenolojik çalışmalar ile ilgilidir. Arayüz boyunca homojen olmayan akım dağılımı ayrıca bir kapasitans dağılımına yol açar, ancak bu etki ara yüzün doğal özellikleriyle ilişkili değildir. Dispersiyonun çeşitli nedenleri, gerçek deneysel sistemlerde neredeyse ayrılabilir bir şekilde bir arada bulunabileceğinden, ölçümleri iyonik sıvılarla veya sulu çözeltilerle temas halinde tek kristalli metallerin iyi tanımlanmış arayüzleri sistemleri ile yoğunlaştırılabilir. Kapasitif sistemlerin empedansları  $Z(\omega)$  düşük frekanslarda tipik olarak çok büyük olduğundan, arayüzey

kapasitesi tercihen, karmaşık kapasitansın hayali kısmının benzer şekilde gerçek parçaya karşı çizildiği karmaşık bir düzlemde görselleştirilebilir. Dielektrik çalışmalarında kullanılan gösterimler. Bununla birlikte, bu gösterimde, elektrokimyasal empedansın seri (tipik olarak elektrolit) direnci  $R_s \equiv \text{Re}(Z(\omega \rightarrow \infty))$ , böylece  $C(\omega) \equiv 1 / [j\omega(Z(\omega) - R_s)]$  tanım denklemiyle düzeltilmesi gerekir.  $(\omega - R_s)$  burada  $j$  ve  $\omega$  sırasıyla bir görsel birim ve açısal frekanstır. Faradaik reaksiyonların yokluğunda, ideal bir “elektrostatik” çift tabakanın şarj edilmesinin,  $C$  frekansından bağımsızmış gibi  $Z(\omega)$  verdiğini unutmayın. Bu nedenle,  $C(\omega)$ 'nin frekans bağımlılığı ideal kapasitif davranıştan sapmanın iyi bir ölçüsüdür. Bununla birlikte, eşdeğer devrelerin parametreleri,  $C(\omega)$  yerine fiili olarak ölçülen boşluğa (tipik olarak empedans) takılmalıdır [71].

## **2.4. Biyosensör Uygulamaları**

### **2.4.1. Klinik Tanı**

Her ne kadar biyosensör gelişimi son yıllarda büyük bir ilerleme sağlasa da, küresel biyosensör pazarının yaklaşık % 90'ını temsil eden glikoz biyosensörleri dışında klinik tanıdaki uygulamaları çok yaygın değildir. Gerçek numunelerle yapılan ölçümler sırasında istenmeyen moleküller ile olan etkileşimler ve ayrıca yüksek seçicilik ve doğruluk hala ciddi bir konudur. Çünkü tedavi genellikle bireysel klinik belirteç seviyelerine dayanır. Tarif edilen biyosensörlerin çoğu, biyosensörlerin gelişimindeki eğilimleri gösteren amperometrik tekniklere dayanmaktadır. Glikoz konsantrasyonu, diyabet ve diğer endokrin metabolik bozukluklar gibi birçok hastalıkta en çok izlenen göstergelerden biridir. Kan şekeri ayrıca elektrolitler ve kan gazlarından sonra ölçülen en yaygın analittir.

### **2.4.2. Çevresel Tarama**

Çevre kirliliğinin izlemesinde, kimyasal analiz kendi başına, kirli suların ve atık suların ekolojik riskini değerlendirmek için yeterli bilgi sağlamayabilir. Avrupa Birliği'nde, su arıtımı için daha katı taleplerin yanı sıra (91/271 / EEC sayılı Konsey Direktifi), endüstriyel ve kentsel atık sularının, atıkların çevreye boşaltılmasından önce belirli toksisite sınırlarına uymaları gerekmektedir. Bu nedenle son yıllarda toksisite değerlendirmesi için birçok biyo-analiz ve biyosensör geliştirilmiştir. Örneğin, Microtox® (Azure, Bucks, UK) toksisite analizleri, çevresel numunelerden toksisiteyi ölçmek için ışık saçan bakteri *Vibrio fischeri*'nin kullanımına



dayanmaktadır. Diğer bir örnek, hızlı ekotoksisite analizi için *Escherichia coli* bakteri hücrelerini içeren bir amperometrik sensör olan Cellsense®'dir. Elektronları uygun bir karbon elektrotun hareketsiz bakteri solunum sisteminden çıkarmak için ferrisiyanür kullanır. Ortaya çıkan akım, bir bakteriyel solunum aktivitesi ile orantılıdır [72].

Doğal sulardaki pestisitlerin varlığı, tarımsal amaçlı yaygın kullanımlarından kaynaklanmaktadır. Her ne kadar HPLC / MS ve GC / MS teknikleri pestisit tespiti için tatmin edici sonuçlar sunsa da, yeni analizler ve biyosensörler yerinde analiz için daha ucuz ve daha hızlı bir yol sunar. Seçilen bir enzimin inhibisyonunu kullanan biyosensörler, pestisitlerin belirlenmesinde kullanılan en yaygın biyosensörlerdir. Asetil kolinesteraz (AchE) ve kolin oksidazın inhibisyon ilkeleri, organofosfor ve karbamat pestisitlerin tespiti için üretilmiş çeşitli biyosensörler için kullanılmaktadır[73]. AchE inhibisyonuna dayalı biyosensörler seçici değildir, unk AchE organofosforlu pestisitler, karbamat pestisitler ve diğer birçok bileşiği içeren nrotoksinler tarafından inhibe edilir. Bu nedenden dolayı bir pestisit sınıfının miktar tayini için kullanılamazlar.

### **2.4.3. Yiyecek Kontrolü**

Gıda endüstrisi ve biyoteknoloji, biyosensör uygulamalarının tıbbi teşhis alanındaki kadar yaygın olmadığı alanlardır [46]. Bu nedeni, tıbbi alanda ana matrislerin kan, serum veya idrar olmasına rağmen, gıda sektöründe, çok değişken kompozisyona sahip daha fazla numune türü olmasından kaynaklanabilir. Bu, biyosensör tasarımı, birleştirme ve ölçüm koşullarının optimizasyon sürecini daha zor hale getirmektedir. Biorealis Ltd. şirketi, Kimya ve Gıda Teknolojileri Fakültesi'nde Beslenme ve Gıda Değerlendirme Bölümü ve lm Bilimleri Enstitüsü ile birlikte, Slovak Bilimler Akademisi, biyosensörleri kullanan portatif analitik cihaz Omnilab'ı geliştirmiştir. Bu cihaz için tasarlanan amperometrik biyosensörler oksidoredüktaz enzimlerine dayanır ve şaraplarda ve içeceklerde glukoz, fruktoz, gliserol, laktik, malik veya asetik asit gibi analitler ölçülebilir.

Gıda kalite kontrolü gıda işlemesinde en önemli aşama olup hammadde kalitesi, işleme sırasındaki kontaminasyonun belirlenmesi, son ürün kalitesi ve raf ömründe gıdada meydana gelen değişimler hem üretici hem de tüketicisi açısından

önemli faktörlerdir. Bu nedenle bu kademelere hızlı, seçici ve yüksek hassasiyette cihazlara gereksinim duyulmaktadır. Gıda analizlerinde, kalıntı, toksin, katkılar, karbonhidratlar, mikroorganizmalar, alkol ve fenoller, aminoasitler, biyojen amin ve heterosiklik bileşikler, organik ve inorganik bileşiklerin tayinine yönelik biyosensörler geliştirilmektedir. Ancak yapılan çalışmaların çoğu gerçek örnekler yerine model örnekler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Biyosensörler için bazı uygulama alanları aşağıda yer almaktadır.

- Klinik teşhis, biyomedikal sektör
- Proses kontrolü
- Gıda üretim ve analizi
- Tarım ve veterinerlik
- Bakteri ve virüs teşhisi
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık su kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Maden işletmelerinde zehirli gaz analizleri
- Askeri uygulamalar

Gıdalara uygulanan analizlerin temel amacı kalite ve güvenlidir. Kalitenin amacı, bir takım fiziksel özellikler ile kimyasal bileşenlerin miktarını saptamaktır. Güvenlikten amaç ise zararlı mikroorganizmaları, toksinleri ve diğer allerjen ve toksik bileşenlerin miktarlarını tespit etmektir. Bunun haricinde gıdalara dışarıdan katılmış olan maddelerin de tespiti oldukça önemlidir.

Biyosensörler ürünlerin kalite kontrollerinde ve gıda endüstrisinin çeşitli uygulamalarında kolaylık sağlayabilir. Biyosensörler, kromatografik yöntemlerle karşılaştırıldığında ise “yüksek seçicilik” ve hızlı cevap süresi” olmak üzere iki çeşit avantajı bulunmaktadır. Gıda endüstrisinde biyosensörler, doksanlı yılların sonunda çok az sayıda kullanılmaktaydı. Kullanılanlar ise off-line analiz niteliğindedir. Gıda analizlerinde elektrokimyasal sistemler ve enzim sistemleri kombinasyonu ile oksidaz bazlı sistemler ticari açıdan daha baskındır. Hücre doku ya da mikroorganizma temelli biyosensörler, uzun cevap süreleri nedeniyle kısıtlı kullanıma sahiptir. Enzimlerin

saflaştırılması, enzim stabilizasyonu ve immobilizasyon yöntemlerine ilişkin gelişmeler ve biyosensörlerde cevap hızının artması, analiz sürelerinin azalmasına yardımcı olmaktadır. Biyosensörlerin eş zamanlı veri sağlama teknikleri, basit tasarımlarıyla beraber maliyetlerinin düşük olması, gıda üretiminde kalite ve güvenliğin izlenmesine olanak sağlamakla beraber çok çeşitli uygulamalarda kullanılmasına da imkân tanıyacaktır. Örneğin optik biyosensörler; asetaldehit, glikoz, nitrat, gliserol, alanin, laktat, ksilitol, glutamat, etanol ve sorbitol gibi çeşitli bileşenlerin konsantrasyonlarının tespit edilmesinde potansiyel uygulama alanı bulacağı düşünülmektedir. Bunun dışında et ve süt ürünlerinde ilaç kalıntıları, hormonlar, antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi ve gıdaya bulaşan *Salmonella*, *Listeria* ve *Staphylococcus* gibi çeşitli mikroorganizmaların belirlenmesi biyosensörler tarafından gerçekleştirilebilmektedir [74].

Aflatoksinlerin ciddi sayıda ölümlere neden olması sebebiyle aflatoksin kaynaklarını tespit etmek, en önemlisi de bu toksinin hızlı tayin yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir.

### **Tezin Amacı**

Tez çalışmasında, aflatoksin M1'in spesifik antikor molekülü ile antijenik aflatoksin M1'in birleşmesinin elektrokimyasal olarak algılanmasına dayanan, aflatoksin M1'in tayinine yönelik bir immunosensör tasarımı gerçekleştirmek amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Toksinler ve Antikor

Projede aşağıda belirtilen toksinler ve antikor kullanılmıştır.

*Aspergillus flavus*'dan elde edilen Aflatoxin M1 (SIGMA)

*Petromyces albertensis*'dan elde edilen Okratoksin A (SIGMA)

Aflatoxin Antibody (abcam)

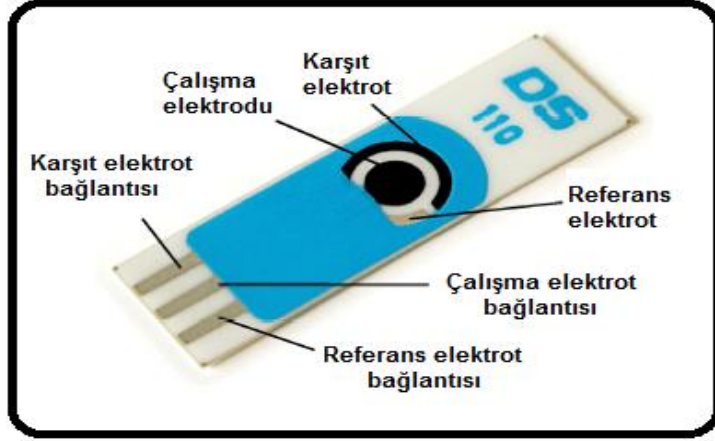
##### 3.1.2. Elektrotlar

Projede kullanılan elektrot, temin edildiği marka ve özellikleri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Projede kullanılan elektrot

Elektrotlar	Marka ve özellikleri
Perde baskılı karbon elektrot (Screen-printed carbon electrode, SCPE)	Dropsens marka Elektrotun Boyutları: 3,4 x 1,0 x 0,05 cm (Uzunluk x genişlik x yükseklik) 4 mm boyutunda karbondan yapılmış çalışma elektrodu, karşı elektrot platin, referans elektrodu gümüştür. Elektrik bağlantıları gümüştedir. Çalışma hacmi 50 µL'dir.

Çalışmalarda sensör yüzeyi olarak tek kullanımlık SCPE elektrotlar kullanılmıştır, böylece mikroarray teknolojisine yönelik kullan – at tekniği adı da verilen bir tasarım gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan SCPE üçlü elektrot sistemi halindeki sensör yüzeyi Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** Tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar (SCPE –Dropsens) sensör yüzeyleri ve üçlü elektrot sistemleri

### 3.1.3. Kimyasallar ve çözeltiler

Projede kullanılan kimyasallar ve çözeltiler sırasıyla Tablo 3.2 ve 3.3 'de verilmiştir. Kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Kullanılan çözeltiler steril deiyonize su kullanılarak hazırlanmış ve gerekli pH ayarlamaları yapılmıştır.

Tüm tampon çözeltilerin pH ayarlamaları 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ilavesiyle yapılmış ve bu çözeltiler +4°C'de muhafaza edilmiştir. Diğer çözeltiler taze hazırlanarak kullanılmıştır. Deneysel çalışmaları oda sıcaklığında ( $25.0 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ) gerçekleştirilmiştir.

Altın nanopartikül (AuNP, Sigma) 5nM koloidal çözeltisi kullanılmıştır.

**Tablo 3.2.** Projede kullanılan kimyasallar

<b>Kimyasallar</b>	<b>Temin edildiği marka</b>
Potassium hexacyano-ferrate(II) trihydrate, $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$	SIGMA-ALDRICH
Potassium hexacyano-ferrate(III), $K_3[Fe(CN)_6]$	SIGMA-ALDRICH
N-Hydroxysuccinimide, NHS	FLUKA
1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)karbodimid hidroklorid (EDC)	Thermo Scientific
Potassium dihydrogen phosphate, $KH_2PO_4$	SIGMA-ALDRICH
di- Potassium hydrogen phosphate, $K_2HPO_4$	SIGMA-ALDRICH
Sodium chloride, NaCl	SIGMA-ALDRICH
Acetic acid	SIGMA-ALDRICH
Sodium hydroxide	SIGMA-ALDRICH
Trizma® hydrochloride	SIGMA-ALDRICH
Potassium chloride	SIGMA-ALDRICH
Bovine Serum Albumin, Fraction V	SIGMA-ALDRICH

**Tablo 3.3.** Projede kullanılan çözeltiler ve içerikleri

<b>Çözelti</b>	<b>Çözeltinin içeriği</b>
Fosfat tampon çözeltisi (PBS)	10 mM $KH_2PO_4$ ve 40 mM $K_2HPO_4$ 20 mM NaCl (pH 7.4)
Antikor bağlama tampon çözeltisi (Kovalent Bağlama Ajanı)	0.05 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile hazırlanmış 5 mM N-hidroksi suksinimit (NHS) ve 8 mM 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil) karbodiimid hidroklorid (EDC)
Ölçüm Solüsyonu	0.05 M fosfat tampon çözeltisi içinde hazırlanmış 5 mM $[Fe(CN_6)]^{3-/4-}$ solüsyonu

### 3.2. Yöntemler

Aflatoksin M1 tayinine yönelik geliştirilen immunosensörlerde, antikor kaplı elektrot yüzeyleri hedef molekül olan AFM1 ile muamele edilerek ölçüme tabi tutulmuştur. Ölçüm tekniği olarak üçlü elektrot sistemine dayanan elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemi kullanılmıştır.

Okratoksin A, proje kapsamında tasarlanan immunosensörlerin seçiciliğinin tayin edilmesi amacıyla antikora bağlanmayan non-spesifik hedef molekül olarak kullanılmıştır. Biyosensörün seçiciliği, sensör yüzeylerine aflatoksin M1 seçici antikorun, aflatoksin M1 bağlanması ve diğer moleküle olan affinitesi arasındaki farka bakılarak tespit edilmiştir.

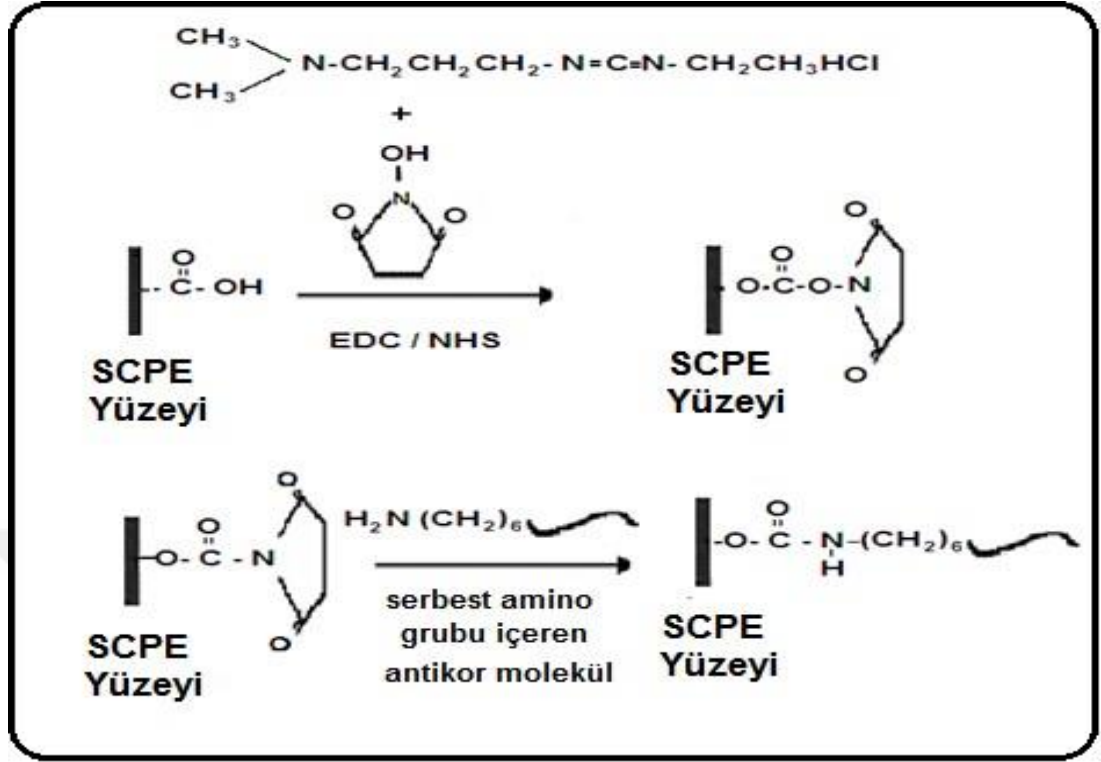
Çalışma protokolü, boş elektrot yüzeylerinde ve altın nanopartikül kaplı yüzeylerde olmak üzere iki tiptir.

#### 3.2.1. Boş Elektrot Yüzeylerinde AFM1 Tayini

Çalışma, sensör yüzeylerinin kimyasal aktivasyonu, antikor bağlanması, AFM1 ve non-spesifik hedef molekül olan OTA ile etkileşimi ve ölçüm basamaklarından oluşmaktadır.

**Elektrot yüzeylerinin kimyasal aktivasyonu:** Antikorun, elektrodun yüzeyine kovalent bağlama ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrot yüzeylerindeki (perde baskılı elektrot) karboksil gruplarını aktive etmek için çalışmalardan hemen önce hazırlanan 5 mM N-hidroksi süksinimit (NHS) ve 8 mM 1-etil-3-(3-(dimetilamino) propil) karbodiimid hidroklorid (EDC) içeren yüzey kaplama çözeltisi (kovalent bağlama ajanı) içinde 1 saat inkübe edilmiştir. EDC aracılı kovalent bağlama işleminin etkinliğinin artırılması için NHS çözeltisi de kullanılmıştır.

Şekil 3.1'de gösterildiği gibi elektrot yüzeyindeki karboksil (-COOH) gruplarının EDC/NHS ile aktive edilmesinden sonra aflatoksin M1 antikoru ile kovalent yolla bağlanabilir hale gelmiştir.



Şekil 3.2. SCPE yüzeyine antikor molekülünün kovalent bağlarla bağlanması

**Antikorum sensör yüzeyine bağlanması:** Serbest amino grubu içeren antikor molekülleri, kovalent bağlanma yöntemi ile elektrot yüzeyine bağlanmıştır. Antikorların yüzeye immobilize edilmesinden sonra yüzeyde kalan özgül olmayan bağlanma bölgeleri BSA çözeltisi (bloke edici ajan, BSA= bovine serum albümin gibi spesifik olmayan bir protein) ile bloke edilmiştir. Bu işlemin amacı hedef hücrelerin sadece kendisine özgü antikorlar ile birleşmesini sağlamak, özgül olmayan etkileşimleri engellemek, dolayısıyla daha spesifik bir tayin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

**Hedef molekül ile etkileşim:** Hedef molekül olan aflatoxin M1 ve non-spesifik OTA molekülü çözeltileri, antikor kaplı sensör yüzeylerine farklı derişimler de gönderilerek bağlanma gerçekleştirilmiştir.

**Elektrokimyasal Algılama:** Sensör yüzeyinde gerçekleşen aflatoxin M1 bağlanması, EIS kullanılarak AUTOLAB PGSTAT-30 analiz sisteminde (Eco



Chemie, Hollanda) tayin edilmiş, bunun için sensör yüzeyinin elektriksel direnci 5mM'lık  $(FeCN)_6^{3/4}$  çözeltisi varlığında tespit edilmiştir.

**Biyosensör Seçimliliği:** Tasarlanan biyosensörlerin hedef proteine spesifik olduğunu kontrol etmek amacıyla, aflatoksin M1'e yapıcı benzeyen okratoksin A (Sigma, O1877) sensör yüzeyindeki antikor ile etkileştirilmiştir. Tayin, antikor molekülü bağlanmadan önce, bağlandıktan sonra ve hedef aflatoksin ile ve nonspesifik OTA ile etkileşimden sonra alınan ohmik dirençler arasındaki farklılanmaya dayanmaktadır.

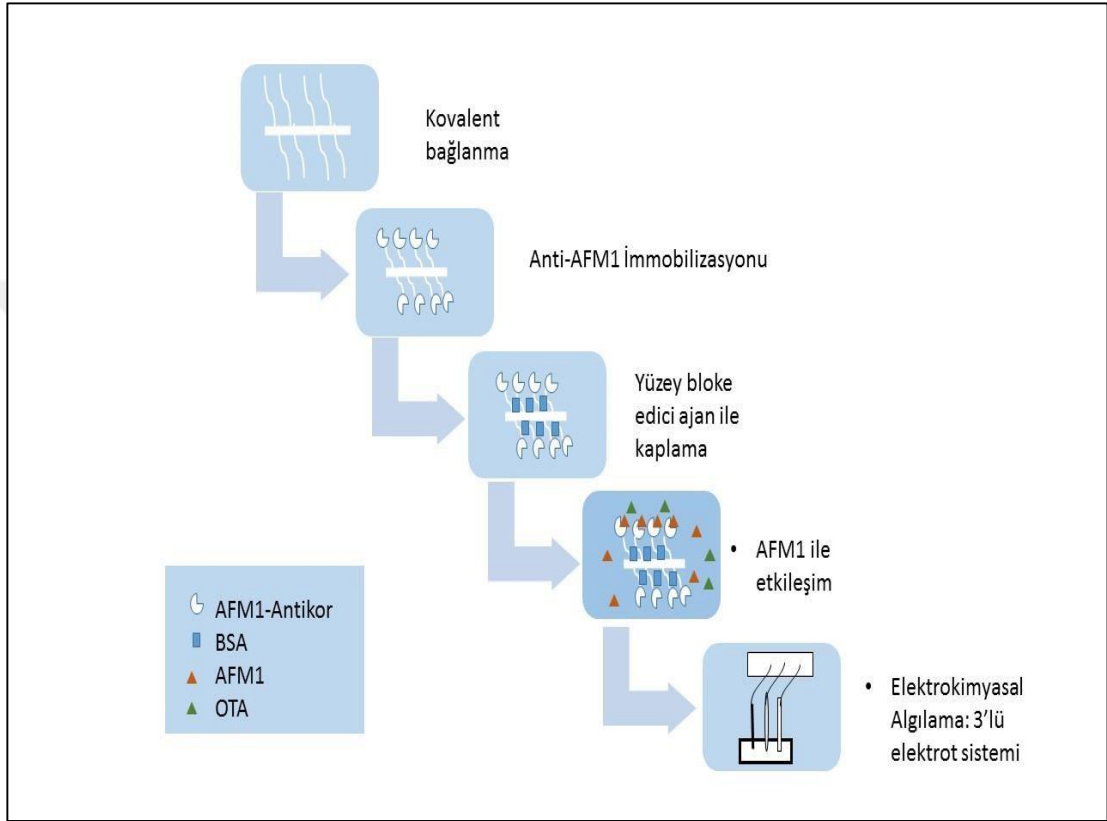
**Elektrokimyasal ölçümler:** Ölçümler, Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) yöntemi kullanılarak AUTOLAB PGSTAT-30 analiz sisteminde (Eco Chemie, Netherlands) gerçekleştirilmiştir. İmpedimetrik ölçümler, FRA 2 yazılımı yardımıyla okunabilir elektrik sinyallerine dönüştürülmüştür.

EIS yöntemi, üçlü elektrot sisteminine bağlı bulunan bir elektrokimyasal çevirici sisteme dayanmaktadır. Analizlerde kullanılan cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit (incelenecek madde) ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır. Çalışmada kullanılan perde baskılı elektrot, karbondan yapılmış çalışma elektrodu, platinden karşı elektrot, gümüşten referans elektrot kısımlarından oluşmaktadır. Elektrodun elektrik bağlantıları gümüştedir.

İmpidimetrik çalışmalarda, Elektrokimyasal Empedans Spektroskopi tekniği kullanılmıştır. İmpedimetrik ölçümler elektron aktarımına dayalı olarak 5 mM  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  içerisinde 10 kHz- 10 mHz frekans aralığında, 0.24 V sabit potansiyel altında ve 10 mV alternatif akımda alınmıştır. Elde edilen Nyquist diyagramları Randles devre modeli kullanılarak analiz edilmiştir. PBS (pH 7.4) çözeltisi içinde hibridizasyondan önce ve sonra azalan frekansa karşı elektrot yüzeylerinin Ohm cinsinden elde edilen yük transfer direnci ( $R_{et}$ ) ölçülmüş ve bütün sonuçlarda  $R_{et}$  (yük transfer direnci) verileri kullanılmıştır.

Yapılan tüm analizler en az 5 ölçüm alınarak yapılmış ve aritmetik ortalamaları hesaplanmıştır.

Boş elektrot yüzeylerinde yapılan denemelerde kullanılan elektrokimyasal yöntem basamakları Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.3.** Çalışmada kullanılan elektrokimyasal yöntem basamakları

AFM1 tayinine yönelik tasarlanan immunosensörde en uygun tayin koşullarının belirlenmesine yönelik farklı parametreler incelenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmada analitik yanıt olarak, anti AFM1 kaplı sensör yüzeylerinde hedef molekül olan AFM1 ve spesifik olmayan hedef molekül olan OTA ile elde edilen yanıtlar arasındaki farklılaşma esas alınmıştır. Buna göre, antikor ve hedef molekül derişimlerinin tayine etkileri incelenmiştir.

### **3.2.3. İmmunosensör tasarımı için uygun antikor ve hedef toksin derişimlerinin belirlenmesi**

Hem zaman hem de kullanılan antikor ve toksinlerin miktarları ekonomik açıdan önemli olduğu için bunların en uygun derişimlerinin belirlenmesi gerekmektedir

En uygun antikor molekülünün konsantrasyonunun belirlenebilmesi için antikor derişimleri 0.1, 0.2,0.5 ve 1 µg/mL olacak şekilde artan konsantrasyonlarda sabit derişimdeki hedef moleküle karşı etkileri incelenmiştir. Buna göre artan derişimlerdeki anti-AFM1 yüzeylere bağlanmış, hedef toksin olan AFM 1 ve non spesifik toksin OTA ile etkileşmeden önce ve sonra ölçülen Rct değerlerinin incelenmesiyle en uygun anti AFM1 konsantrasyonu belirlenmiştir.

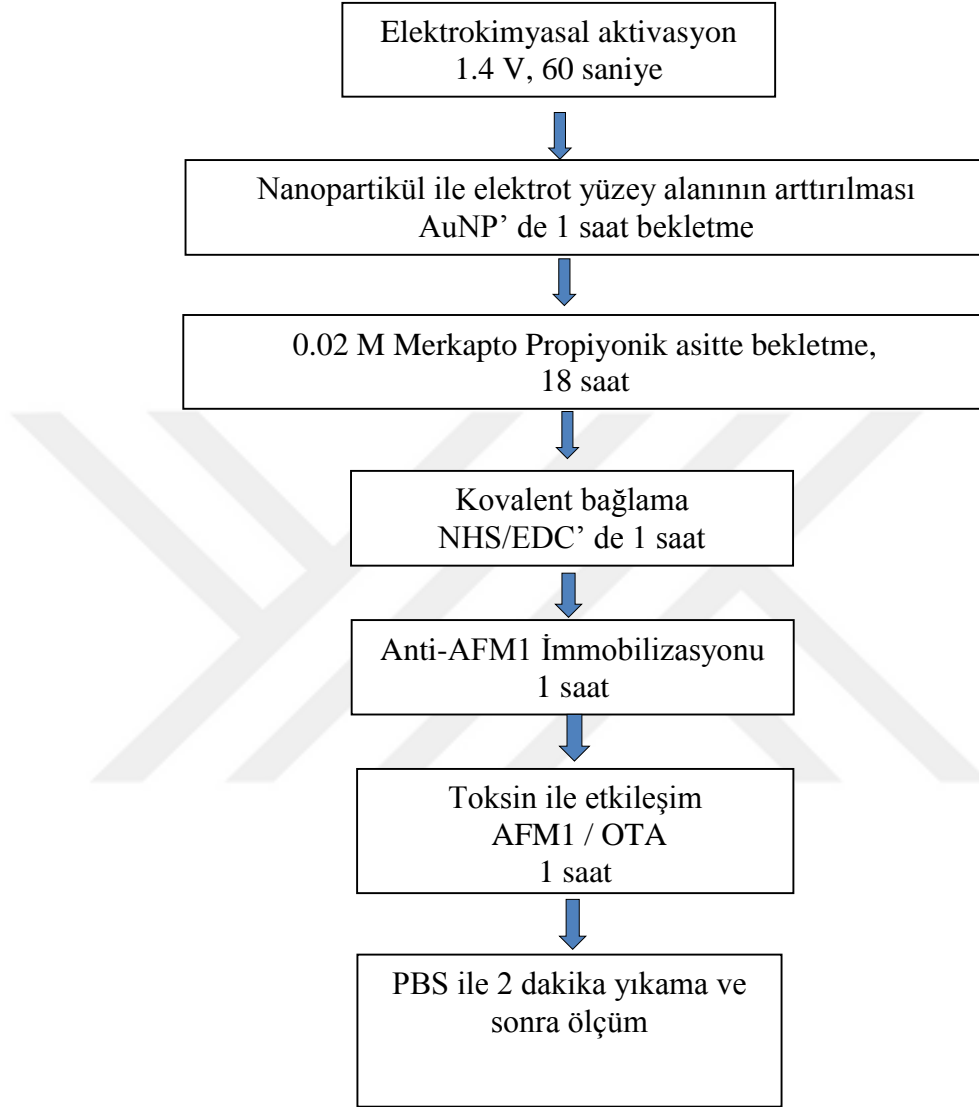
En uygun antikor derişiminin saptanmasının ardından bu anti AFM1 derişiminde en uygun hedef toksin derişimi, artan AFM 1 ve non-spesifik OTA molekülleri ile aradaki farkın değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 ve 1 µg/mL hedef toksin derişimlerinde Rct verileri değerlendirilerek en uygun derişim belirlenmiş ve çalışmalara bu derişimlerle devam edilmiştir.

Yapılan çalışmada kullanılan antikor ve hedef toksin derişimleri belirlendikten sonra çalışmada kullanılan tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar yerine altın nanopartikülde de denemeler yapıldı.

### **3.2.4. Altın Nanopartikülle Yapılan Elektrokimyasal Çalışmalar**

Yukarıda saptanan koşullar altında, gerçek süt örnekleri kullanılarak. altın nanopartiküllere (Au-NP) dayalı elektrokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın basamakları Şekil 3.2’de verilmiştir. Bu çalışmada elektrotun elektrokimyasal aktivasyonunu sağlamak amacıyla 1.4 V potansiyel 60 saniye boyunca uygulanmıştır. Daha sonra elektrot yüzey alanının arttırılması amacıyla altın nanopartikül (AuNP) çözeltisinde 1 saat ardından merkapto propiyonik asit çözeltisinde 18 saat bekletilmiştir. Kovalent bağlanmanın meydana gelebilmesi için NHS/EDC’de 1 saat bekletilen elektrotlar, AFM1 antikorunun immobilize olması için 1 saat beklenmiştir. Daha sonra hedef toksin olan AFM1 ve non-spesifik OTA

molekülleri ile etkileşimleri incelenerek bulunan en uygun derişimlerin çalışıp çalışmadığına bakılmıştır.



**Şekil 3.4.** Altın nanopartiküllere (Au-NP) dayalı elektrokimyasal AFM1 analizine yönelik çalışma

### 3.2.5. Süt Örnekleri ile AFM1 Tayini

Bu çalışmada AuNP modifiye yüzeyler ile boş elektrot yüzeyleri kullanılmış ve gerçek süt örneklerinde AFM1 tayini karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın tüm basamakları Şekil 3.1. ve 3.2'de belirtilen basamakları içermekle birlikte, marketten çiğ olarak alınan süt örneği analize hazır hale getirmek

için birkaç ön işlem den geçirilmiştir. Süt ilk olarak 6000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek yağsız katman Pasteur pipeti ile aspire edilerek ayrılmıştır( Neagu ve Perrino, 2009). Elde edilen yağsız süt ikinci bir ön işlem için 20 mM Dulbecco's PBS (180 mM CaCl<sub>2</sub>, %1 metanol, pH 7.4) çözeltisi ile karıştırılmıştır (Parker ve Tohill, 2009). Daha sonra süt örneklerine AFM1 ve OTA eklenmiştir ve gerekli ölçümler yapılmıştır.

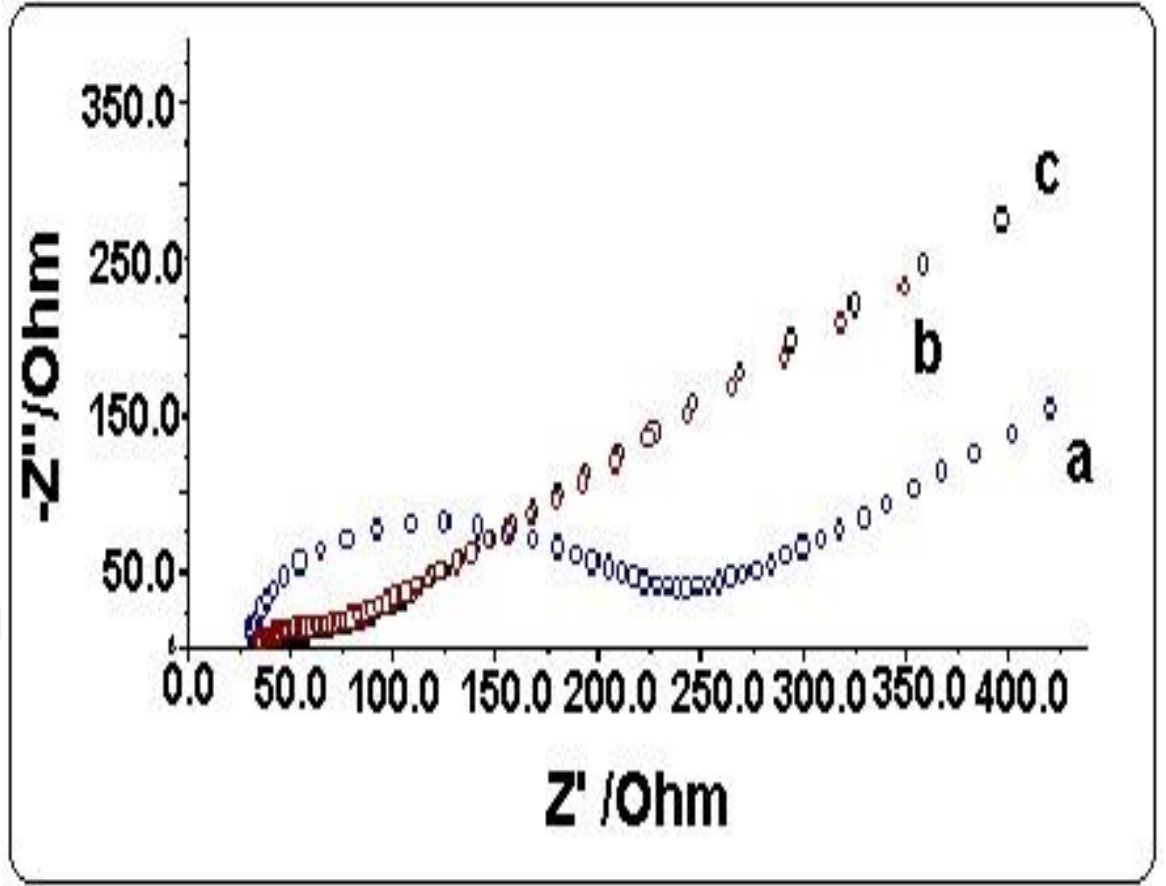


#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışmada gıda güvenliğinde önemli bir yer tutan aflatoksin M1 (AFM 1) toksininin sütte tayinine yönelik elektrokimyasal immunosensör geliştirilmiştir. Mikroarray teknolojisine yönelik kullan-at tekniği adı verilen bir tasarım gerçekleştirilerek, tek kullanımlık perde baskılı grafit elektrotlar (SCPE) sensör yüzeyi olarak kullanılmıştır. Tasarlanan immunosensörde, AFM 1'e spesifik bir antikor molekül (anti-AFM1) kullanılarak sensör yüzeyine bağlanmış, anti AFM 1- AFM 1 etkileşmesi elektrokimyasal bir ölçüm tekniği olan Elektrokimyasal Empedans Spektrometrisi (EIS) ile değerlendirilmiştir.

Grafit yapısında olan SCPE sensör yüzeylerine kovalent bağlama tekniği kullanılarak antikor molekülün serbest amino grubundan bağlanması sağlanmış, böylece yüzeyleri antikor kaplı biyomodifiye sensörler elde edilmiştir. Bu yüzeyler hedef molekül olan AFM 1 ile etkileşime tabi tutulduğunda, yüzeyde oluşan antikor – AFM 1 kompleksi EIS yöntemi ile 5mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  çözeltisi içinde R2 ohmik direnç yanıtları değerlendirilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1'de SCPE yüzeylere antikor molekülünün bağlanma kimyası gösterilmektedir.

Tasarlanan immunosensörün seçiciliğinin tayin etmek amacıyla farklı bir mikotoksin olan Okratoksin A (OTA) molekülü kullanılmıştır. Buna yönelik yapılan çalışmalarda, anti- AFM 1 – AFM 1 etkileşiminin yanı sıra, anti AFM- OTA etkileşimi de EIS ile görüntülenmiş ve elde edilen direnç farklılıkları analitik yanıt olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.1'de buna yönelik gerçekleştirilen ilk çalışmaya ait EIS Nyquistik plot dataları verilmiştir. Anti AFM 1 kaplı elektrot yüzeylerinde herhangi bir toksinle etkileşmeden önce (c) elde edilen R2 ohmik direnç değeri ile, bu antikora spesifik olmayan OTA molekülüyle etkileşimin ardından alınan yanıtın (b) birbirine oldukça yakın ve düşük olduğu, diğer yandan, antikor kaplı yüzeyin AFM 1 hedef molekül ile etkileşiminin ardından (a) direncin anlamlı bir şekilde yükseldiği izlenmektedir. Bu da tasarlanan immunosensörün AFM1'e spesifik olduğunu göstermiştir.

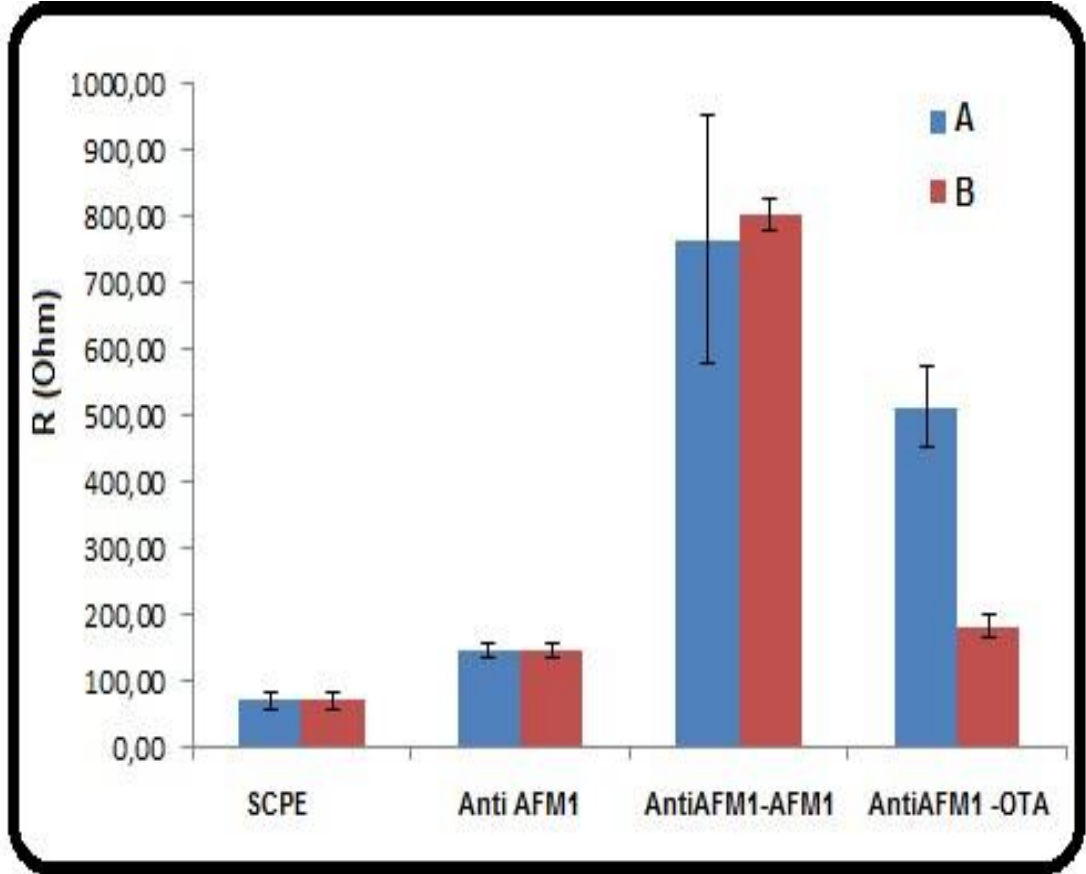


**Şekil 4.1.** Anti AFM-1 kaplı sensör yüzeyinde, a) AFM-1 ile, b) non spesifik OTA ile bağlandıktan sonra, c) yalnızca antikör molekül ile kaplı yüzeylerden elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri.

Tasarlanan immunosensörün daha seçici ve etkili tayin gerçekleştirilmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Buna yönelik yapılan ilk çalışmada, sensör yüzeyinin blokajı deneyleri gerçekleştirilmiştir. AFM1 ve OTA ile etkileşiminden önce, yüzeyi antikör molekül ile kaplanmış olan sensörler bovine serum albümin ile kaplanmış ve kaplanmamış yüzeyler incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir.

Şekil 4.2’de, anti AFM1 bağlanmadan ve bağlandıktan sonra elde edilen veriler değerlendirildiğinde boş yüzeylere oranla oldukça anlamlı bir bağlanmanın olduğu gözlenmiştir. Bu bağlanmanın ardından %1 BSA çözeltisi ile muamele edilmiş ve edilmemiş yüzeyler ile AFM1 /OTA molekülleri ile oluşan yapılar birbiri içinde değerlendirildiğinde, BSA kullanılan yüzeylerden daha tekrarlanabilir ve daha seçici

sonuçlar elde edildiği gözlenmiştir. Yüzeyler AntiAFM1 antikor molekül ile kovalent olarak bağlandıktan sonra, hedef toksin ile etkileşmeden önce, yüzeye yabancı başka bir molekül ya da yapının bağlanmasını önlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, BSA kaplanmamış yüzelerde (A) ve kaplandıktan sonra (B) alınan yanıtlar değerlendirildiğinde AFM1/OTA oranı BSA kaplı yüzelerde daha yüksektir. Bu da yüzey blokajının daha seçici bir immunosensör oluşturduğunun göstergesidir.



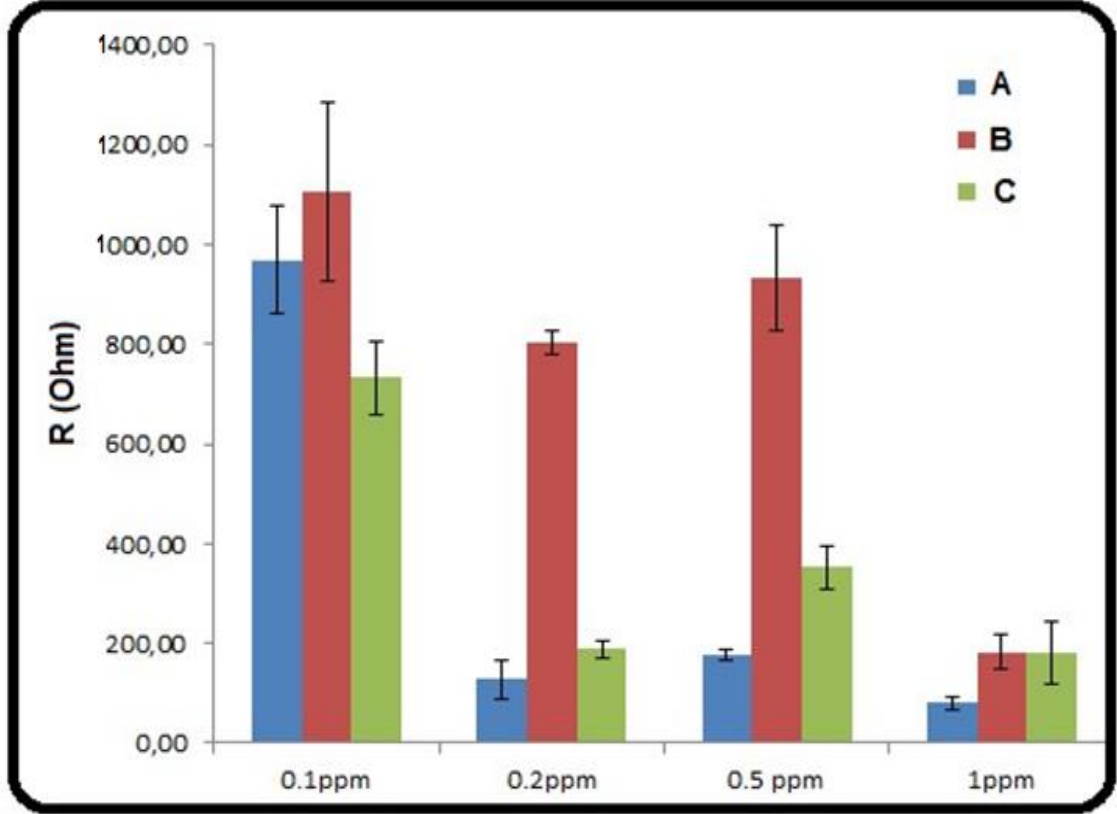
**Şekil 4.2.** SCPE sensör yüzeylerinde, anti AFM1 bağlandıktan önce, sonra ve AFM1 ve OTA ile birleştikten sonra A) BSA ile blokaj yapılmadan B) BSA ile yüzey blokajı yapılarak elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri.

#### 4.1. Anti AFM1 Derişiminin AFM1 Tayinine Etkisi

Yapılan yüzey blokaj çalışmasının ardından en uygun antikor molekülünün derişimine yönelik yapılan çalışmada, artan derişimlerde anti AFM1 yüzeylere bağlanmış ve hedef toksin olan AFM 1 ve non spesifik toksin OTA ile etkileşmeden önce ve sonra alınan empedans ölçümleri Şekil 4.3'de değerlendirilmiştir. Buna göre



elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, 0.1 ppm anti AFM1 kaplı yüzeylerde herhangi bir ayırım gözlenememiş, artan antikor derişimiyle birlikte, tayin daha da zorlaşmıştır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde de en uygun AFM1 /OTA ayırımının 0.2 ppm ile elde edildiği gözlenmiştir.

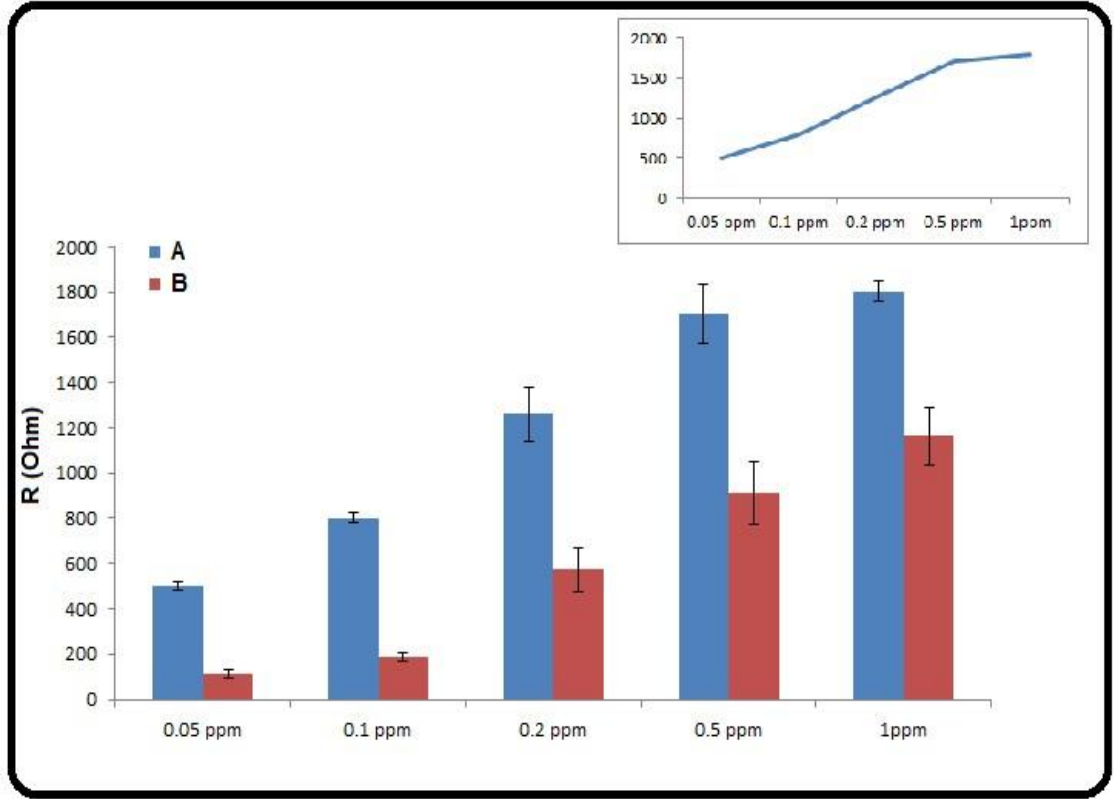


**Şekil 4.3.** Artan derişimlerde anti AFM 1 kaplı sensör yüzeylerinden AFM 1 ile hedef toksin ile birleşmeden önce (A), AFM 1 ile (B) ve OTA (C) ile birleştikten sonra elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri.

#### 4.2. En Uygun Hedef Toksin Derişiminin Belirlenmesi

En uygun antikor derişiminin saptanmasının ardından 0.2 ppm anti AFM1 kaplı yüzeylerde en uygun hedef toksin derişimi artan AFM 1 ve non-spesifik OTA molekülleri ile aradaki farkın değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4’da bu çalışmaya ait sonuç gözlenmektedir. Elde edilen spektrometri verileri değerlendirildiğinde, toksin derişiminin artmasıyla yanıtlarında arttığı ancak en uygun ayırımın 0.1 ppm toksin derişimiyle elde edildiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tayin sınırı (LOD) 0.3 ppb olarak hesaplanmıştır. Bu da tasarlanan

immunosensörün hem yüksek seçicilikte hem de yüksek hassasiyette olduğunu göstermektedir.

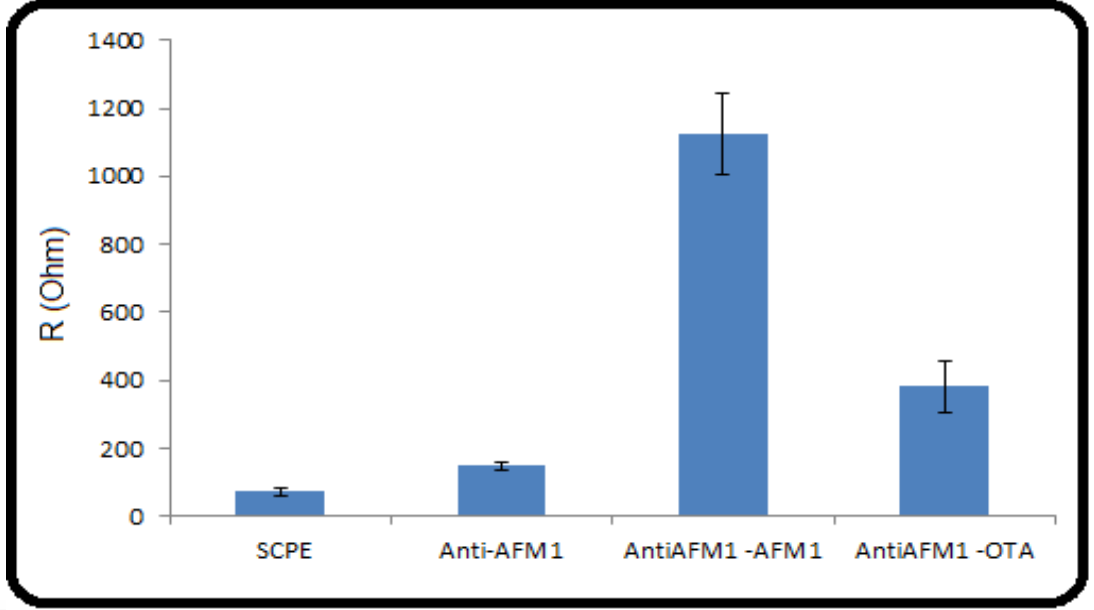


**Şekil 4.4.** 0.2 ppm anti AFM 1 kaplı sensör yüzeylerinde artan derişimlerde (A)AFM 1 ile (B)OTA ile birleştikten sonra elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri.

$y = 351x + 161,53$  ve  $R^2 = 0,9694$  olarak saptanmış buna göre 0.3 ppb LOD tespit edilmiştir. LOD, Rameil ve ark. (2010) göre tespit edilmiştir.

### 4.3. Süt Örneklerinde AFM1 Tespiti

Tüm bu çalışmalarının ardından, elde edilen veriler doğrultusunda ve saptanan koşullar altında gerçek süt örnekleri ile analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5’de, SCPE yüzeylerinde, 0.2 ppm antikor kaplanmadan önce çıplak elektrot yüzeyinde (SCPE), kaplandıktan sonra (anti- AFM1) ve 0.1 ppm AFM1 ve OTA ile etkileşimden sonra alınan EIS verileri gösterilmiştir.

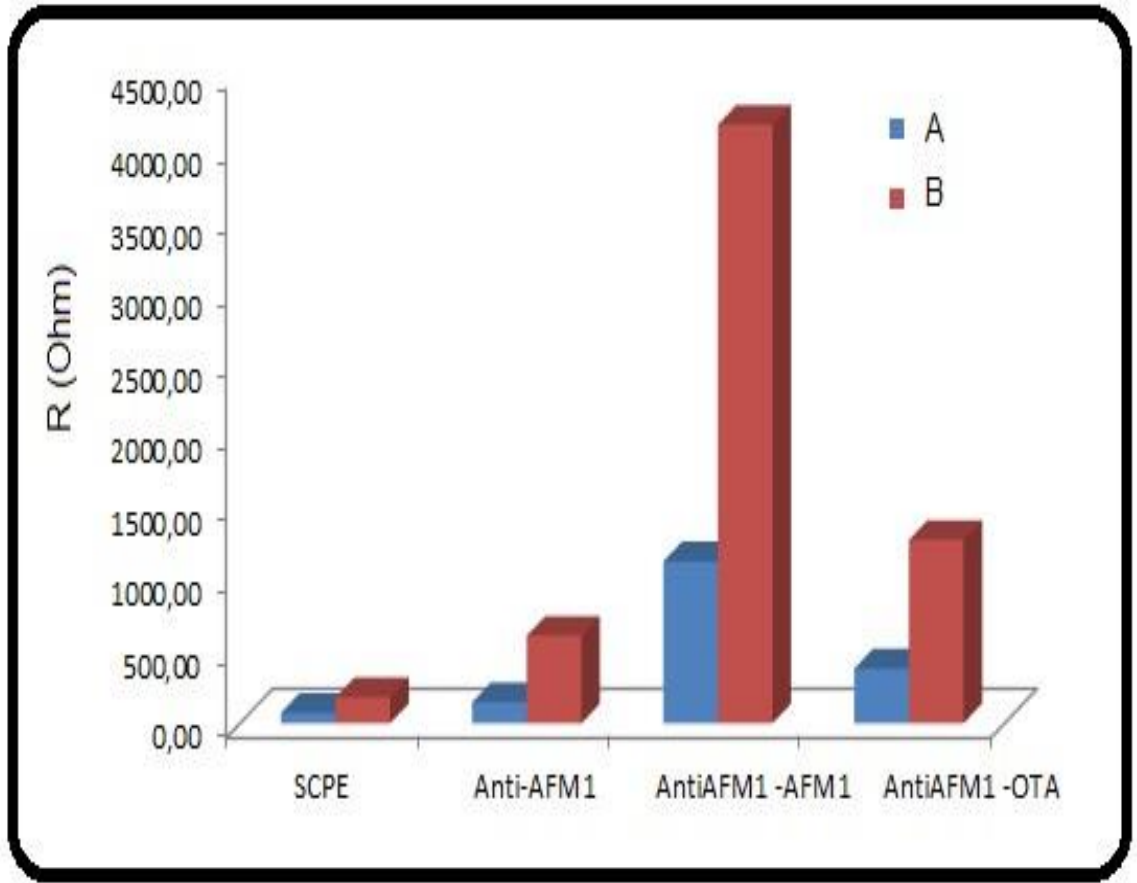


**Şekil 4.5.** SCPE sensör yüzeylerinde, anti AFM1 bağlanmadan önce, sonra ve AFM1 ve OTA ile birleştikten sonra elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri.

#### **AuNP modifiye edilmiş Sensör Yüzeylerinde Süt Örneklerinde AFM1 Tespiti**

Çalışmamızın diğer bir kısmında altın nanopartiküller (AuNP) kullanılmıştır. AuNP modifiye edilmiş sensör yüzeylerinde gerçekleştirilen çalışmada, AuNP modifiye edilmemiş (9A- SCPE) ve edilmiş (9B AuNP/SCPE) yüzeylerde farklı süt örnekleri ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6'deki veriler değerlendirildiğinde, AuNP modifiye yüzeylerde alınan yüksek yanıtlar ile hassasiyetin oldukça arttığı gözlenmektedir.

Genel olarak literatür incelendiğinde biyosensör alanında yapılan çalışmalarda yüksek hassasiyette, kullanımı kolay, uygun maliyetli, taşınabilir cihazların geliştirilmesi ve geliştirilen sistemin çoklu ve sürekli izleme yeteneğine sahip olması gerektiği belirtilmektedir. Ayrıca, biyosensörler ile yapılan çalışmalarda asıl amacın tespit limitini düşürmek olduğu görülmektedir. Bu amaçla pek çok farklı yöntem kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 4.6.** AuNP modifiye edilmemiş (A) ve edilmiş (B) sensör yüzeylerinde, anti AFM1 bağlanmadan önce, sonra ve AFM1 ve OTA ile birleştikten sonra elde edilen elektrokimyasal empedans spektrometri verileri.

Aflatoksin M1 tayinine yönelik yapılan çalışmaları incelendiğinde; Micheli ve arkadaşlarının (75, 2005) yaptığı bir çalışmada, perde baskılı elektrotlar kullanılarak sütte aflatoksin M1 tayinine yönelik elektrokimyasal immünosensör tasarımı yapılmıştır. Bu çalışmada ilk olarak, spektrofotometrik enzime bağlı bir immünosorbent deneyi oluşturmak için antikor miktarları ve etiketli antijen, tampon ve pH, her bir adımın süresi ve sıcaklığı (ön kaplama, kaplama, bağlama ve rekabet aşamaları) gibi immünoassay parametreleri değerlendirilip optimize edilmiştir. Geleneksel yöntemlerle tespit edilen aynı toksin seviyelerini ölçebilen bir AFM1 immünosensörü oluşturmak için ELISA sisteminin sadeliğinden faydalanılmıştır. Daha sonra elektrokimyasal immünosensörler, antikorların doğrudan ekrana basılmış elektrotların (SPE'ler) yüzeyine doğrudan hareketsiz hale getirilmesi ve serbest AFM1 ile peroksidaz (HRP) enzimiyle konjüge edilmiş olanlar arasında rekabetin

gerçekleşmesine izin verilmiştir. Ayrıca sistemde, basit bir santrifüjleme aşamasını dışında herhangi bir seyreltme veya başka ön işlem aşamaları olmadan AFM1'in doğrudan sütteki ölçüm yapılması en avantajıdır. Sonuç olarak perde baskılı elektrotlar kullanarak aflatoksin M1'in 25 ppt saptama sınırında ve 30 ila 160 ppt çalışma aralığı arasında ölçülebilir olduğunu göstermiştir. Ayrıca spektrofotometrik ve elektrokimyasal prosedürler kıyaslandığında elektrokimyasal yöntem kullanılarak daha iyi bir saptama sınırı ve kısa analiz süresi elde edilebilmiştir.

Parker ve Tothill (76, 2009) bir çalışmalarında, aflatoksin M1 analizi için bir elektrokimyasal immüno sensörün geliştirilmesi için tek kullanımlık perde baskılı elektrot kullanmışlardır. Bunun için immün bileşenleri elektrot yüzeyine immobilize edildikten ve test formatını optimize ettikten sonra, sütün sensör üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Süt matrisinin önemli girişime neden olduğu ve kimyasal fraksiyonlama yoluyla, girişimin temel olarak peynir altı suyu proteinlerinden kaynaklandığı görülmüştür. Süt numunesine ve yıkama tamponuna fazla miktarda kalsiyum klorür (Dulbucco's PBS formundaki 18mM) ilave edildiğinde, etki bastırılmış ve 1 g'a kadar lineer algılama aralığı ile 39 ng 'ye kadar bir çalışma kalibrasyonu elde edilmiştir. Bu nedenle, süt numunelerini metal elektrotlar üzerinde stabilize etmek için kalsiyum klorür kullanılması tavsiye edilmiştir. İmmüno sensörün HPLC ve ELISA teknolojileri ile karşılaştırılmasında ise immüno sensörün duyarlılığının iyi ve bu yöntemlere göre daha portatif olduğu bildirilmiştir.

Neagua ve arkadaşları (77, 2009) çalışmalarında aflatoksin M1'in (AFM1) belirlenmesi için oldukça hassas bir yöntem olan doğrudan rekabetçi bir tahlile dayalı immüno sensör gelişimi için aralıklı nabız amperometrisine (IPA) bağlı tek kullanımlık çok kanallı mikrop laka kullanarak çalışmışlardır. Süt numunelerinde AFM1 için elektrokimyasal enzime bağlı immüno sorbent analizi (ELISA) prosedürü oluşturmak üzere immünolojik test parametreleri değerlendirip optimize edilmiştir. İmmüno sensörlerin sütte doğrudan toksin analizi için uygunluğu değerlendirilmiştir. AFM1, 5 - 250 pg mL<sup>-1</sup> çalışma aralığı ve 1 pg mL<sup>-1</sup> tespit sınırı ile ölçülmüştür. Geri kazanım değerleri (% 90–105) elde edilmiştir. Metod, bu toksinin donmuş (-30 ° C) veya liyofilize (4 ° C) süt numunelerinde 3 aya kadar saklanan geri kazanılmasını incelemek için kullanılmıştır. İlk toksin kontaminasyon seviyelerine göre ölçülen

AFM1 konsantrasyonunun anlamlı fakat değişken bir azalma olduğunu (>% 50) bulmuşlardır.

Paniel ve arkadaşları (78, 2010) çalışmalarında, gıda ürünlerinde ultra eser miktarlarda aflatoksin M1'in (AFM1) tespiti için bir elektrokimyasal immünoensör geliştirmiştir. Sensör, yabancurpu peroksidazı (HRP) bir etiket olarak kullanan rekabetçi bir immünoassaya dayanmaktadır. Bağlanmış ve bağlanmamış fraksiyonları ayırmak için antikor (anti-AFM1) ile kaplı manyetik nanoparçacıklar kullanılmıştır. AFM1 içeren örnekler, sistem dengeye ulaşana kadar sabit miktarda antikor ve izleyici [HRP'ye (konjugat ile bağlantılı AFM1)] inkübe edilmiştir. Rekabet, antijen (AFM1) ile antikor için konjugat arasında meydana gelmektedir. Daha sonra, karışım perde baskı karbon elektrotların yüzeyinde toplanmış ve [5-metilfenazinyum metil sülfat (MPMS)] eklenmiştir. Enzimatik cevap amperometrik olarak ölçülmüştür. Standart bir aralık (0, 0.005, 0.01, AFM1 için standart bir eğri elde etmek için ELISA kitinden elde edilen 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.3, 0.4 ve 0.5 ppb) AFM1 ile kontamine olmuş süt kullanılmıştır. Sensörün algılama hassasiyetini test etmek için ticari süt örnekleri 0.01, 0.025, 0.05 veya 0.1 ppb'de tamamlanmıştır. İmmünoensörün, önerilen AFM1 0.05 µg L-1 (ppb) seviyesinin altında bulunan düşük bir tespit limitine 0.01 ppb'ye ve iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu immünoensör, geleneksel yöntemler için bulunanlardan daha iyi veya karşılaştırılabilir bir çalışma aralığına sahiptir. Yukarıda bahsedilen biyosensörler etiketli biyosensörlerdir ve bu sensörler pahalıdır. Bu tez kapsamında daha ucuz ve hassas olan etiketsiz biyosensör geliştirmeye çalışılmıştır. Sistemimiz, çok fazla ön işlem aşamaları olmadan tek bir santrifüjleme aşamasından sonra AFM1'in doğrudan süt içinde ölçülmesine izin verir. Metodumuzun bir başka avantajı, analiz süresinin kısaltılmış olması ve numune hazırlamanın konvansiyonel metotlara kıyasla çok basit ve hızlı olmasıdır (örneğin, HPLC ve ELISA). İleriki çalışmalarda nanopartiküller kullanarak gıda maddelerinin sıhhi kontrolünün otomasyonuna izin verecek bir protokol geliştirerek bu immünoensörü optimize etmektedir. AFM1 için nanopartiküller ile optimizasyonu gerçekleştirilebilirse, bu test sistemi, bu toksin için çığ süt numunelerinin hızlı taranması için iyi bir yöntem olacaktır. Bu immünoensör, ucuz, kullanımı kolay ve otomasyona çok uygun olacaktır.

Dinçkaya ve arkadaşları (79, 2011) çalışmalarında, aflatoksin M1'in tespiti için bir DNA biyosensörü tasarımı gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada aflatoksin M1'i spesifik olarak bağlayan tiyol ile modifiye edilmiş tek zincirli bir DNA (ss-HSDNA) probunu hareketsizleştirmek için, SAM üzerindeki kendiliğinden birleştirilmiş bir sistemin ve altın nanoparçacık tabakası altın elektrotlar üzerinde tabaka tabaka hazırlanmıştır. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve sıklık voltametri (CV) teknikleri yardımıyla sistemin, altın nanopartiküller ve ss-HSDNA'nın montaj işlemleri izlenilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler için redoks sondası olarak  $K_3[Fe(CN)_6]$  /  $K_4[Fe(CN)_6]$  çözeltisi kullanılmıştır. Biyosensör, aflatoksin M1'in konsantrasyon aralığı 1-14 ng / mL, standart sapması ise  $\pm 0.36$  ng / mL olarak bulunmuştur. Son olarak, biyosensör bir dizi gerçek süt örneğine de uygulanmıştır.

Bacher ve arkadaşları (80, 2012), sütte aflatoksin M1'in (AFM1) tespiti için gümüş (Ag) tel elektroduna dayanan oldukça hassas ve seçici bir etiketsiz impedimetrik immünosensör yapılmıştır. Sensör, AFM1'in seçici monoklonal antikoları ile birleştirilmiş Ag telinin, kendiliğinden monte edilmiş mono tabakaları vasıtasıyla işlevselleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Antijen-antikor etkileşimi, 10 mV uygulanan ac potansiyelindeki frekans aralığındaki (1-100 Hz) empedansa bakılarak ölçülmüştür. AFM1 için analiz süresi 20 dakikadır ve doğrusal çalışma aralığı 6.25–100 pg mL<sup>-1</sup>'dir. Sensör hassasiyetinin, 6.25 pg mL<sup>-1</sup> kantitatif limiti ve 1 pg mL<sup>-1</sup> saptama limiti ile her on yılda yaklaşık % 2.1 empedans değişimi olduğunu bulmuşlardır. Süt örneklerinde SD = 1.13 ve R2 = 0.982 ile iyi geri kazanımlar elde edilmiştir.

Nguyen ve ark. (81, 2013) çalışmalarında, AFM1 tespiti için Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> / PANi bazlı elektrokimyasal aptasensör geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Manyetik nanopartiküllerin sinyal güçlendirme rolleri nedeniyle analitik çekici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca çalışmada, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> içeren polianilin (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> / PANi) filmi, AFM1 elektrokimyasal biyosensörü için hassas film olarak birbirine bağlı elektrot (IDE) üzerinde polimerize edilmiştir. Algılama platformunda bir afinite yakalama reaktifi olarak immobilize edilmiş aptamerler ve sinyal amplifikasyon elemanı için manyetik nanopartiküller kullanılmıştır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> / PANi arayüzünde aptamer-AFM1'in etiketsiz ve doğrudan tespiti, dögüsel ve kare dalga voltametreleri ile elde edilen elektrokimyasal sinyal değişimi ile yapılmıştır. Basitleştirilmiş bir stratejiyle, bu

elektrokimyasal aptasensör AFM1'e 6–60 ng.L<sup>-1</sup> aralığında ve 1.98 ng. L<sup>-1</sup> saptama sınırında çok iyi hassasiyet göstermektedir. Sonuçlar, diğer biyomedikal uygulamalar için uygun maliyetli aptasensörleri tasarlanmanın yolunu açmaktadır.

Kanungo ve arkadaşları (82, 2014) çalışmalarında, süt ürünlerinde aflatoksin M1 (AFM1) ve aflatoksin M2 (AFM2) analizi için empedansa dayalı etiketsiz algılama tekniğini incelemiştir. Antijen-antikor etkileşiminden kaynaklanan empedans değişikliği, gümüş (Ag) telden yapılan iki elektrotlu bir kurulum kullanılarak incelenmiştir. Yoğurt ve aromalı süt örnekleri gibi işlenmiş sütün (akış tabanlı bir düzende) analizi yapılmıştır. Analitlerin (AFM1 ve AFM2) enjekte edildiği ve empedansın işlevselleştirilmiş Ag tel elektrotları kullanılarak ölçüldüğü akış sistemini oluşturmak için iki mikro akış pompası kullanılmıştır. Akış sistemi, empedans ölçümleri için reaksiyon hacmini optimum tutmak için hem giriş hem de çıkış akışlarını ayarlayarak optimize edilmiştir. Bode grafiği kullanılarak, matris etkisi, çeşitli matrislerde AFM1 ve AFM2'nin saptanması için araştırılmıştır. 1-100 pg / mL aralığında düşük AFM1 konsantrasyonlarında bile iyi geri kazanımlar elde edilmiştir. AFM2'nin AFM1'in tespiti üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Önerilen yöntem, süt ürünlerindeki bu tür zararlı toksinlerin çevrimiçi izlenmesi için iyi bir kapsam sağlar.

Istamboulié ve arkadaşları (83, 2016) yapmış olduğu çalışmada sütte aflatoksin M1'in (AFM1) DNA-aptamer tanıma ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi tespiti esasına dayanarak belirlenmesi için bir aptasensör tasarlanmıştır. Algılama yüzeyinin diazonyum aktivasyonundan sonra aptasensör gelişiminin her basamağını karakterize etmek için ferri/ferrosiyanür redoks probu varlığında dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılmıştır. Aptamer AFM1 etkileşimi, 2-150 ng/L (LOD =1.15 ng / L) aralığındaki tampon içinde AFM1'in belirlenmesine izin vererek, elektron transfer direncinde bir artışa neden olmuştur. Süt analizine uygulama ön muamelenin zorunlu olduğunu göstermiştir. 0.2 µm'lik bir PTFE membrandan yapılan basit bir filtrasyon, sütte AFM1'in 20 ila 1000 ng / kg arasında değişen konsantrasyonlar için belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bu performanslar Avrupa Birliği'nde yetişkinler için süt ve süt ürünleri (50ng / kg) ve bebekler (25ng / kg) için belirlenen AFM1 seviyeleri ile uyumludur.



Guo ve arkadaşları (84, 2016) tarafından yapılan çalışmada eş zamanlı olarak 20 dakika içinde süt ürünlerinde melamin ve aflatoksin M1 gibi farklı bileşikleri belirlemek için kompleks düzlemsel dalga kılavuzu floresan immunosensörler (MPWFI) dayanan etkili bir izleme yöntemi kurulmuştur. Tüm tanımlama sistemi az miktarda numune ile yüksek hassasiyette hem nitel hem de nicel veriler elde edilmiştir. Ancak, bu teknik özel ekipman kullanarak karmaşık etiketleme sistemi gerekmektedir. Gıda güvenliğini ve çevreyi koruma amacıyla gıda ve yem hammaddelerinin kirleticileri ve kimyasalları eş zamanlı izlenilebilmesi için teknolojinin en iyi şekilde kullanılması gerekmektedir.

Guo ve arkadaşları ayrıca bu çalışmalarında, aflatoksin M1 ve melaminin hızlı, hassas ve eşzamanlı tespiti ve nicelleştirilmesi için multipleks düzlemsel dalga kılavuzu floresan immünosensörü (MPWFI) ile dolaylı bir rekabetçi immünolojik test sunmaktadır. Uygun lojistik korelasyona sahip çift kanallı standart eğriler ( $R_2 > 0.99$ ) sırasıyla çizilmiştir. Çalışma aralıkları (sırasıyla 0.073-0.400 ng / mL ve 26.38- 270.00 ng / mL) ve aynı anda iki analit tespit edildiğinde tespit sınırı (sırasıyla 0.045 ve 13.37 ng / mL) hesaplanmıştır. Her iki sonuç da mevcut yöntemin diğer bazı standart yöntemlerden daha iyi olduğunu göstermek için WHO tarafından belirlenen maksimum miktarlarla karşılaştırılmıştır. Gerçek numunelerdeki geri kazanım oranları % 85 ile % 103 arasında değişmiştir, göreceli standart sapmalarda %1.3 ile % 6.5 arasındadır ve bu da yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik göstermiştir.

Karczmarczyk ve arkadaşları (85, 2017) çalışmalarında, etiketli bir enzim (alkalin fosfataz) ile modifiye edilmiş perde baskılı altın elektrotlar (AuSPE) kullanarak voltametrik algılama yöntemi ile AFM1 ve OTA tayini araştırılmıştır. Tasarlanan biyosensöre, numune ekstraktının ön işlemine veya ön konsantrasyonuna gerek kalmadan kırmızı şarap ve süt numunelerinde ölçümler yapılmıştır. Analitik sinyal, geniş bir çalışma doğrusal aralığında toksin konsantrasyonuyla orantılıdır ve ng mL<sup>-1</sup> düzeylerinde tespit limiti belirlenmiştir.

Jalalian ve arkadaşlarının (86, 2018) çalışmalarında, AFM1'in hassas ve seçici tespiti için elektrot yüzeyinde AuNP'lerin hedef kaynaklı immobilizasyonuna ve redoks probu olarak metilen mavisine dayanan bir elektrokimyasal aptasensör hazırlanmışlardır. AFM1 aptamerinin (Apt) AFM1 varlığında ve yokluğunda yapısal

değişimi, AFM1'in saptanması için elektrokimyasal aptasensörün duyarlılığını ve seçiciliğini önemli ölçüde arttırmıştır. Apt'nin yapısının AFM1 varlığında ve yokluğunda ve ayrıca negatif yüklü AuNP'lerin konformasyonel değişimi, AFM1'in yüksek hassasiyet ve seçicilik ile saptanmasına neden olduğu belirlenmiştir. AFM1'in yokluğunda, Apt'nin firkete yapısı sağlam olduğu böylece, zayıf bir tepe akımı elde edilmiştir. Bununla birlikte, AFM1'in eklenmesi Apt'nin firkete yapısını değiştirmiş böylece, CS-modifiyeli AuNP'ler elektrot yüzeyinin yakınlığına yaklaşmış ve redoks ajanı olarak metilen mavisi eklenmesi üzerine güçlü bir akım sinyali kaydedilmiştir. Aptasensör, AFM1'in 0.9 ng/L saptama limitiyle belirlenebilmiştir. Üretilen aptasensör, serum ve süt örneklerinde AFM1'i iyi tanımlayabilmiştir.

Yüksek hassasiyet, düşük maliyetler (ucuz ve tek kullanımlık SPE kullanımı ve reaktiflerin bir damlacık hacmine indirgenmesi, reaktiflerin hacmine indirgenmesi), kısa analiz süresi gibi özellikler iyi tasarlanmış bir biyosensörün özellikleridir. Bu çalışmada tasarlanan biyosensörün tayin sınırı AFM1 için (LOD) 0.3 ppb olarak hesaplanmıştır. Ülkemizde ve Avrupa Birliği'nde sütteki AFM1'in maksimum miktarı 0.05 ppb (0.025 ppb bebek gıdalarında) olarak belirtilirken Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) bu toksinin maksimum miktarını miktarının 0.5 ppb (0.25 ppb bebek gıdalarında) olarak belirtmiştir. Bu tez çalışmasında tasarlanan biyosensör ile FDA'nın belirlediği sınırlar dâhinde hem yüksek seçicilikte hem de yüksek hassasiyette analizin gerçekleştirilebileceği belirtilebilir. Ancak Ülkemizde ve Avrupa Birliği'nde kabul edilen değerler düşünüldüğünde biyosensörün tespit limitinin düşürülmesi gerekmektedir. Bu nedenle biyosensörün tespit limitini düşürmek için nanopartiküller kullanarak ucuz, kullanımı kolay ve otomasyona uygun bir protokol geliştirerek immünosensör tasarımı için optimizasyonun yapılması gerekmektedir. Eğer AFM1 için nanopartiküller ile optimizasyonu gerçekleştirilebilirse, çiğ süt örneklerinde bu toksin tayini için iyi bir yöntem olacaktır.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada aflatoksin M1'in spesifik antikor molekülü ile antijenik aflatoksin M1'in birleşmesinin elektrokimyasal olarak algılanmasına dayanan, aflatoksin M1'in tayinine yönelik bir immunosensör tasarımının oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda aflatoksin M1 tayinine ilişkin geliştirilen immunosensörlerde üçlü elektrot sistemine dayanan elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemi tercih edilmiştir. Tasarımı amaçlanan immunosensörlerin seçicilik tayininde okratoksin A materyali kullanılmıştır. Tasarlanan biyosensörün seçiciliği, sensör yüzeylerine aflatoksin M1 seçici antikorun, aflatoksin M1 bağlanması ve diğer moleküle olan affinitesi arasındaki farka göre belirlenmiştir.

Çalışmada öncelikle Anti AFM1 ile kaplanan elektrot yüzeylerinin toksinlerle etkileşimine bakılmıştır. Öncelikle hedef molekül AFM1 ve seçicilik kazandıran OTA molekülü ile etkileşim dirençleri incelenmiş ve immunosensörün en yüksek direnci AFM1 hedef molekülünde gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuca dayanarak tasarlanan immunosensörün AFM1'e spesifik olduğu kanısına varılmıştır.

Ardından sensör yüzeylerine yabancı bir molekül veya yapının bağlanmaması için blokaj çalışmaları yapılmıştır. Bunun için blokaj çalışmalarında BSA kullanılmıştır. Daha sonra BSA ile kaplanan ve kaplanmayan yüzeylerin yanıtları değerlendirilmiştir. Bulgulara göre AFM1 /OTA etkileşimlerinin BSA kaplı yüzeylerde daha yüksek olduğu görülmüştür ve blokaj işleminin bu çalışma için önemi vurgulanmıştır.

Genel olarak biyosensör tasarlamamızda gerekli özelliklere bakıldıktan sonra biyosensörlerin en önemli özelliklerinden biri olan maliyetin düşük olması için derişim değerlerinin belirlenmesi çalışmalarına geçilmiştir. Çünkü derişim değerleri ne kadar az olursa yapılan çalışmanın maliyeti o kadar az olacaktır.

Çalışmamızda ilk olarak AFM1 uyumlu olan antikor derişimine bakılmıştır. Çalışmada kullanılan tek kullanımlık perde baskılı elektrotlar ile en uygun antikor derişimi 0.2 ppm olarak belirlenmiştir.

Antikor derişimini belirledikten sonra toksin derişimlerini belirleme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen spektrometri verileri değerlendirildiğinde ise toksin derişiminin artmasıyla yanıtlarında arttığı ve en uygun ayırımın 0.1 ppm toksin derişimiyle elde edildiği gözlenmiştir.

Yapılan tüm derişim çalışmalarından sonra elde edilen sonuçlara göre tayin sınırı (LOD) 0.3 ppb olarak hesaplanmıştır. Bu da tasarlanan immunosensörün hem yüksek seçicilikte hem de yüksek hassasiyette olduğunu göstermektedir.

Optimizasyon deneyleri sonrasında gerçek süt numuneleriyle yapılan analizde ise 0.2 ppm anti AFM1 kaplı sensör yüzeylerin AFM1 ile birleşimi sonrasında konsantrasyon artışı ile birlikte yüksek yanıtlar elde edilmiştir. Benzer şekilde Anti AFM1- AFM1 birleşimi, gerçek süt numunelerinde en yüksek hassasiyeti gösteren bulguları içermiştir.

Çalışmanın son bölümünde kullanılan altın nanopartiküller ile hassasiyet ölçülmüş, AuNP modifiye edilmiş ve edilmemiş sensör yüzeyleri farklı süt numuneleriyle değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda AuNP modifiye yüzeyin yanıtı daha yüksek bulunmuş ve hassasiyetin oldukça arttığı gözlenmiştir.

Dünyanın her yerinde süt ve süt ürünleri insanlar tarafından sıklıkla tüketilmektedir. Fakat süt ve süt ürünlerindeki aflatoksin M1 varlığı ise sağlık açısından önemli risk teşkil etmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığı açısından aflatoksinlerin toksikleri kanserojenik ve mutajenik etkileri tehdit edebilecek seviyelerde bulunmaktadır. Ayrıca süt ürünlerinin özellikle bebekler ve yetişme çağındaki çocuklar tarafından fazlaca tüketilmesi ileride yaşanabilecek sağlık sorunlarını göz önünde bulundurulduğunda aflatoksin M1 konusunun ne kadar önemli olduğu gözler önüne serilmektedir.

Halk sağlığı açısından önemli olan bu konuda ilk alınacak önlem ise yemlerde oluşan aflatoksinlerin kontrol altına alınabilir hale getirilmesidir. Sütlerde oluşan AFM1 miktarının en aza indirgenmesi için yemlerde AFM1'in oluşumuna sebep olan AFB1 oluşumunun engellenmesidir. Çünkü sütlerdeki AFM1 pastörizasyon, sterilizasyon gibi ısıl işlemlerden etkilenmemektedir. Kimyasal ve biyolojik yollarla

detoksifikasyon işlemlerinin çok etkili ve uygun olmamasından dolayı yapılacak en önemli işlem yemlere küf bulaşmasının ve aflatoksin üretmelerinin önlenmesi için çalışmalar yapılması daha önemlidir. Ülkemiz küflerin gelişip toksik üretmesi için gerekli sıcaklık ve neme sahip olduğu için hayvanların tükettiği yemlerde aflatoksin üretimini engellemek için üreticiler bu konu hakkında bilinçlendirilmelidir. Ayrıca gerekli resmi kuruluşlar tarafından düzenli olarak da bu aflatoksinler hakkında bilgilendirme çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Böylelikle küflerin aflatoksin üretmelerine izin verilmeden alınan önlemler, süt ve süt ürünlerindeki AFM1 varlığının sıklığı ve seviyesinin azaltılmasında en önemli ve en ucuz maliyetli çözüm yolu olacaktır.

Süt ve süt ürünleri üretim zinciri; mikotoksinler, ilaç kalıntıları ve patojenleri içeren mikrobiyolojik ve kimyasal gıda güvenliği sorunlarına sahne olan çeşitli tehlike kaynaklarını içermektedir. Bu tehlikeler birçok analitik metotla belirlenebilirken, günümüzde bu metotların ölçüm sürelerinin kısa olması, az miktarda numune gerektirmesi, otomasyon kolaylığı ve yüksek duyarlılığa sahip olması arzu edilmektedir.

Mikrobiyolojik analizlerde farklı çeşitleri bulunan biyosensörler, kompleks yapıdaki numunelerde ekstra bir işlem uygulamadan kullanım olanağı sağlamaktadır. Özellikle gıdalarda patojenlerin belirlenmesi işleminde elektrokimyasal biyosensörlerin yüksek duyarlılık, hız, düşük maliyet ve küçük işletmelere uygun olma şeklinde avantajları bulunmaktadır.

Bu çalışmada tasarlanan biyosensörün tespit limitinin düşürülmesi amacıyla ileriki çalışmalarda immünosensörün geliştirilmesi için nanopartiküller kullanarak optimizasyon çalışmalarının yapılması uygun olacaktır.

Nanopartiküllerin en büyük özellikleri olan yüksek yüzey alanı:hacim oranı sayesinde nanopartiküllerle modifiye edilmiş elektrotların yüzey alanları artmakta ve daha etkin immobilizasyon yapılabilmektedir. Nanopartiküller ayrıca elektron transfer hızını da arttırarak duyarlılığı arttırmakta ve tayin limitini düşürmektedir.

Nanopartiküller ile optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra geliştirilecek immünoensörün çığ süt numunelerinde AFM1'in daha hızlı taranmasını gerçekleştirebilir. Gerekli çalışmaları yaptıktan sonra geliştirilecek son immünoensör, kullanımı kolay, ucuz ve otomasyona çok daha uygun olacaktır.

Projemizde tasarlanan immünoensör, rutinde uygulanan pahalı ajanlar ve daha fazla zaman gerektiren enzime dayalı immünoassay teknikleri ve kromatografi tekniklerine alternatif olarak daha ucuz, direkt ve daha düşük tayin sınırlı analiz sağlamaya yönelik bir adım olmuştur. Aynı zamanda tasarımı yapılmış olan sistem, gıda güvenliğini tehdit eden diğer toksinlerin analizlerine de temel alınabilir.



## KAYNAKLAR

1. Chauhan, R., Singh, J. Sachdev, T., Basu, T., Malhotra, B.D. Recent advances in mycotoxins detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, 81, 532–545.
2. Basmacıoğlu, H. ve Ergül, M. Yemlerde Bulunan Toksinler ve Kontrol Yolları. *Hayvansal Üretim*. 2003, 44(1), 9-17.
3. Akande, K.E., Abubakar, M.M., Adegbola T.A. and Bogoro, S.E. Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2006, 5, 398-403.
4. Tedesco, D., Barbieri, C., Lugano, L. Aflatoxin contamination risk: Bioactive natural compounds for animal health and healthy food. *Springer Science+ Business Media B.V.* 2008, 177-178.
5. Creppy, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe: A review. *Toxicology Letters*. 2002, 127, 19–28.
6. Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*. 2001, 122, 179–188.
7. Kırdar S.S., Süt ve Ürünlerinde Mikotoksinler. *Türkiye 9. Gıda Kongresi; Bolu*, 24-26 Mayıs 2006, 307-310.
8. Paniel N., Radoi A. and Marty J.L., Development of an Electrochemical Biosensor for the Detection of Aflatoxin M1 in Milk. *Sensors*. 2010, 10, 9439-9448.
9. Wang H., Zhou X.J., Liu Y.Q., Yang H.M. and Guo Q.L. Determination of aflatoxin M1 in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*. 2010, 27, 1261–1265.
10. Salem NM, Ahmad R. Mycotoxins in food from Jordan: Preliminary survey. *Food Control*. 2010, 21 (8), 1099–103.
11. Hussein, H.S., Brasel, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 2001, 167,101–134.
12. EC Report (EUROPEAN COMMISSION). Scientific committee on plants. Opinion on the relationship between the use of plant protection products on food plants and the occurrence of mycotoxins in foods. Brussel, 1999, SCP/RESI/063.
13. Bryden W. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*. 2012, 173, 134–158.
14. Placinta C. M., D’Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C. A review of World wide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technolog*. 1999, 78, 21-37.
15. Mclean, M., Dutton, M. F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmac Ther*. 1995, 65, 163-192.
16. Wang, J., Groopman, J. D. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*. 1999, 424, 167-181.
17. Galvano, F., Galofaro, V., Ritieni, A., Bognanno, M., Angelis, A.D., Galvano, G. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Additives and Contaminants*. 2001, 18, 644-646.
18. Whitlow, L., Hagler, W. Mycotoxin Contamination of Feedstuffs- An Additional Stress Factor For Dairy Cattle. 2001 [https://projects.ncsu.edu/cals/an\\_sci/extension/dairy/mycoto\\_1.pdf](https://projects.ncsu.edu/cals/an_sci/extension/dairy/mycoto_1.pdf) Erişim Tarihi:10.05.2019
19. Van Egmond HP., Jonker M.A. Worldwide Regulations on Aflatoxins- The situation in 2002, 2004. *Journal of Toxicology TOXIN REVIEWS*. 2004, 23, 273-293.

20. Tunail, N. Funguslar ve Mikotoksinler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Genişletilmiş baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara, Türkiye, 2000, 522 s.
21. Sonal, S., Oruç HH. Bursa bölgesindeki tavuk çiftliklerinden sağlanan yemlerde mikotoksin düzeyleri. YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi. 2000, 11(2), 1-6.
22. Özmenteşe N. İstanbul piyasasından sağlanan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin B1 ve M1 içerikleri yönünden yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılması, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2002, 129 s. (Doktora Tezi)
23. Yentür G, Er B. Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg. 2012, 69(1), 41-52.
24. Hazer A, Denizli ve Aydın İllerinden Elde Edilen Çiğ Sütlerde Aflatoksin M1 Prevalansı ve Miktarının Aranması. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni Anabilim Dalı, Aydın, 2011, VHB-YL-0004.(Yüksek Lisans)
25. Rustom, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chemistry. 1997, 59, 57-67.
26. Akande, K.E., Abubakar, M.M., Adegbola T.A., and Bogoro, S.E. Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: A review. Pakistan Journal of Nutrition. 2006, 5, 398-403.
27. Lynch G.P., Mycotoxins in Feedstuffs and Their Effect on Dairy Cattle. Journal of Dairy Science. 1972, 55, 1243-1255.
28. Özkaya, Ş. ve Temiz, A., Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2003, 1, 1-21.
29. Oruç, H. H., Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin M1 (AFM1) ve Türkiye'deki Durumu. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi. Vet. Med. 2003, 22, 121-125.
30. Guo, H., Zhou, X., Zhang, Y., Song, B., Zhang, J., Shi H. Highly sensitive and simultaneous detection of melamine and aflatoxin M1 in milk products by multiplexed planar waveguide fluorescence immunosensor (MPWFI). Food Chemistry.2016, 197: 359–366.
31. Madalı B., Ayaz A. Süt ve Süt Ürünlerinde Aflatoksin M1: Maruziyet ve Sağlık Riskleri. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi. 2017, 4(1), 1-14.
32. Vig, A., Radoi, A., Munoz-Berbel, X., Gyemant, G., Marty, J.L. Impedimetric aflatoxin M1 immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition. Sensors and Actuators B. 2009, 138, 214–220.
33. Verma RJ. Aflatoxin cause DNA damage. Int J Hum Genet. 2004, 4, 231–6.
34. Papp E, H-Otta K, Záray G, Mincsovcics E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. Microchem J. 2002, 73 (1-2), 39–46.
35. Sabuncuoğlu S.A., Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: Toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. Hacettepe Üni Ecz Fak Derg. 2008, 28 (1), 63–92.
36. Koirala P, Kumar S, Yadav BK, Premarajan KC. Occurrence of aflatoxin in some of the food and feed in Nepal. Indian J Med Sci. 2005, 59 (8), 331–6.
37. Rustom, I.Y.S., Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chemistry. 1997, 59, 57-67.
38. Oveysi MR, Jannat B, Sadeghi N, Hajimahmoodi M, Nikzad A. Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran. Food Control. 2007, 18, 1216–8.
39. Ayub MY., Sachan DS. Dietary factors affecting aflatoxin B1 carcinogenicity. Mal J Nutr. 1997, 3, 161-179.



40. Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect.* 2010, 118 (6), 818–24.
41. El-Tras, W.F.; El-Kady, N.N.; Tayel, A.A. Infants exposure to aflatoxin M1 as a novel foodborne zoonosis. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 2816–2819.
42. Gurban A.M., Equire P, Oancea F, Doni M. Achievements and Prospects in Electrochemical-Based Biosensing Platforms for Aflatoxin M1 Detection in Milk and Dairy Products. *Sensors.* 2017, 17, 2951.
43. Gürbay, A., Sabuncuoğlu, S.A., Girgin, G., Şahin, G., Yiğit, S., Yurdakök, M., Tekinalp, G. Aflatoxin M1 levels in breast milk samples from Ankara, Turkey. *Toxicol. Lett.* 2010, 196-345.
44. De Roma, A., Rossini, C., Ritieni, A., Gallo, P., Esposito, M. A. Survey on the aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from southern Italy. *Food Control.* 2017, 81, 30–33.
45. Carlson, M. A., Bergeron, C. B., Benson R.C., Fraser A.B., Phillips T.E., Velky J.T., Groopman J.D., Strickland P.T., Ko H.W. An Automated, handheld biosensor for aflatoxin. *Biosensor and Bioelectronics.* 2000, 14, 841-848.
46. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. 2008, *IRBM* 29, 171—180.
47. Kara Kadayıfçılar, P. Çeşitli bulaşıcı ve kalıtsal hastalıklara neden olan gen dizilerini içeren PCR ürünü örnekler kullanılarak elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle bu hastalıkların saptanması. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2003, 116s.( Yüksek lisans tezi)
48. Kara Kadayıfçılar, P. Klinik tanıya yönelik DNA hibridizasyonuna dayalı elektrokimyasal genosensör tasarımı, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2007, 136s. (Doktora tezi)
49. Wang X., Watanabe H., Uchiyama S. Amperometric l-ascorbic acid biosensors equipped with enzyme micelle membrane. *Talanta.* 2008, 74, 1681—1685.
50. Monošik R., Stred'ansky M., Šturdik E. Biosensors - classification, characterization and new trends. *Versita.* 2012, 5, 109-120.
51. Liu Z., Yuan R., Chai Y., Zhuo Y., Hong C., Yang X. Highly sensitive, reagentless amperometric immunosensor based on a novel redox-active organic-inorganic composite film. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2008, 25, 625-631.
52. Labib M., Hedström M., Amin M. Mattiasson B. A capacitive immunosensor for detection of cholera toxin. *Analytica Chimica Acta.* 2009, 23, 255-261.
53. Labuda J., Ovadekova R., Galandova J. DNA-based biosensor for the detection of strong damage to DNA by the quinazoline derivative as a potential anticancer agent. *Microchim Acta.* 2009, 164, 371–377.
54. Chen X., Ruan Ch., Kong J., Deng J. Characterization of the direct electron transfer and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase in DNA film at pyrolytic graphite electrode. *Analytica Chimica Acta.* 2000, 412, 89-98.
55. Tian Y., Mao L., Okajima T., Ohsaka T. A carbon fiber microelectrode-based third-generation biosensor for superoxide anion. *Biosensors and Bioelectronics.* 2005, 21, 557-564.
56. Dragone R., Frazzoli Ch., Grappelli C., Campanella L. A new respirometric endpoint-based biosensor to assess the relative toxicity of chemicals on immobilized human cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2009, 72, 273– 279.
57. Aravanis A.M., De Busschere B.D., Chruscinski A.J., Gilchrist LH., Kobilka BJ., Kovacs G.T.A. A genetically engineered cell-based biosensor for functional classification of agents. *Biosensors and Bioelectronics.* 2001, 16, 571-577.

58. Banerjee P., Bhunia A.K. Cell-based biosensor for rapid screening of pathogens and toxins. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010, 26, 99–106.
59. Martin, E.J. Composite Films for Modifying Evanescent Wave Characteristics in Long-Period Grating. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, 2001, 140s. (Master's Thesis)
60. Parkinson, G., Pejicic, B. Using Biosensors Detect Emerging Infectious Diseases. Nanochemistry Research Institute, Curtin University of Technology Perth, Western Australia, Prepared for the Australian Biosecurity Cooperative Research Centre, Final Report. 2005, 80s.
61. Felix, F., Angnes, L. Electrochemical immunosensors- A Powerful tool for analytical applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018, 102, 470–478
62. Lippa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. Immunosenors-Principles and Applications to Clinical Chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2001, 314, 1-26.
63. Wang H., Zhou X.J., Liu Y.Q., Yang H.M. and Guo Q.L. Determination of aflatoxin M1 in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*. 2010, 27, 1261–1265.
64. Kokkinos, C., Economou, A. Prodromidis. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 79, 88–105
65. Chai, R., Yuan, R., Chai, Y., Ou, C., Cao, S. ve Li, X. Amperometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic gonadotrophin. *Talanta*. 2008, 74, 1330–1336.
66. Marty, J.L., Leca, B. Noguier, T. Biosensors for the Detection of Pesticides. *Analisis Magazine*. 1998, 26 (6), 144-149.
67. Macdonald D.D. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*. 2006, 51, 1376-1388.
68. Song J., Bazant M.Z. Electrochemical Impedance Imaging via the Distribution of Diffusion Times. *Physical Review Letters*. 2018,120(11), doi:10.1103/PhysRevLett.120.116001.
69. Fasmin F., Srinivasan R. Review—Nonlinear Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Journal of The Electrochemical Society*. 2017, 164 (7), H443-H455.
70. Ciucci F. Modeling electrochemical impedance spectroscopy. *Current Opinion in Electrochemistry*. 2019, 13, 132–139.
71. Pajkossy T., Jurczakowski R. Review Article Electrochemical impedance spectroscopy in interfacial studies. *Current Opinion in Electrochemistry*. 2017, 1, 53-58.
72. Rodriguez-Mozaz S., Marco M.P., Alda M.J.L., Barcelo D. Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: A review article. *Anal Bioanal Chem*. 2004, 378, 588–598.
73. Mostafa G.A.E. Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides . *The Open Electrochemistry Journal*. 2010, 2, 22-42.
74. Aykut U., Temiz H. Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 2006, 3, 51-59.
75. Micheli, L., Grecco, R., Badea, M., Moscone, D., Paleschi, G. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005, 21, 588–596
76. Parker C.O., Tohill, I.E. Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 in milk with focus on matrix interference. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009, 24, 2452–2457.

77. Neagua, D., Perrino, S., Micheli, L., Palleschi, G., Moscone, D. Aflatoxin M1 determination and stability study in milk samples using a screen-printed 96-well electrochemical microplate. *International Dairy Journal*. 2009, 19, 753–758
78. Paniel N., Radoi A. and Marty J.L. Development of an Electrochemical Biosensor for the Detection of Aflatoxin M1 in Milk. *Sensors*. 2010, 10, 9439-9448.
79. Dinçkaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk, M., Altuğ, Ç., Akkoca, A. Development of an impedimetric aflatoxin M1 biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, 26, 3806–3811
80. Bacher, G., Pal, S., Kanungo, L., Bhand, S. A label-free silver wire based impedimetric immunosensor for detection of aflatoxin M1 in milk. *Sensors and Actuators B*. 2012, 168, 223– 230.
81. Nguyen, B., Tran, L., Do, Q., Nguyen, H., Tran, N., Nguyen, P. Label-free detection of aflatoxin M1 with electrochemical Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/polyaniline-based aptasensor. *Materials Science and Engineering C*. 2013, 33, 2229–2234.
82. Kanungo, L., Bacher, G., Bhand, S. Flow-Based Impedimetric Immunosensor for Aflatoxin Analysis in Milk Products. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014, 174, 1157–1165.
83. Istamboulié G., Paniel, N., Zara, L., Granados, L., Barthelmebs, L., Noguier, T. Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk. *Talanta*. 2016, 146, 464–469.
84. Guo, H., Zhou, X., Zhang, Y., Song, B., Zhang, J., Shi H. Highly sensitive and simultaneous detection of melamine and aflatoxin M1 in milk products by multiplexed planar waveguide fluorescence immunosensor (MPWFI). *Food Chemistry*. 2016, 197, 359–366.
85. Karczmarczyk A., Baeumner A.J., Feller K.H. Rapid and sensitive inhibition-based assay for the electrochemical detection of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in red wine and milk. *Electrochimica Acta*. 2017, 243, 82-89.
86. Jalalian, S., Ramezan, M., Danesh, N., Alibolandi, Abnous, K., Taghdisi, S. A novel electrochemical aptasensor for detection of aflatoxin M1 based on target-induced immobilization of gold nanoparticles on the surface of electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018, 117, 487–492.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülcan SÖZEN İBEK  
Doğum Yeri ve Yılı : İstanbul, 1987  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : gulgansozen06@hotmail.com

### Eğitim Durumu

Lise : Gaziçiftliği Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı), 2001-2005  
Lisans : Mersin Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2006-2011  
Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2012-(halen)

### Mesleki Deneyim

Ege Kurumsal Yemek 2012-2013  
Temsal Yemek Hiz. A.Ş. 2013-2014  
Martaş Yemek ve Gıda Sanayi 2014- 2016  
Yimak Mühendislik Proje Taah. LTD.ŞTİ. 2016- 2018