

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BASKILI ELEKTROKİMYASAL ELİZA (PRINTECELISA)
AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRÜ İLE BETA-KAZOMORFİN-7
(BKM-7) TAYİN METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

**Hazırlayan
Tuğba ÖZKAYA FERAK**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BASKILI ELEKTROKİMYASAL ELİZA (PRINTECELISA)
AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRÜ İLE BETA-KAZOMORFİN-7
(BKM-7) TAYİN METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Tuğba ÖZKAYA FERAK**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI**

Bu çalışma TÜBİTAK 1509 Uluslararası Sanayi Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamındaki 91358 numaralı ve “PRINTED ELECTROCHEMICAL ELISA, PRINTECELISA” başlıklı projesi kapsamında desteklenmiştir.

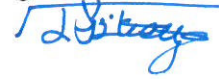
Ocak 2018

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

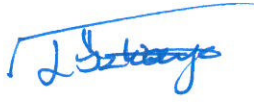
Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Tuğba ÖZKAYA FERAK



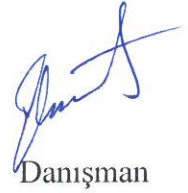
YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Baskılı Elektrokimyasal ELİZA (PRINTECELISA) Amperometrik Biyosensör İle Beta-kazomorfin-7 (BKM-7) Tayini Tasarımı” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



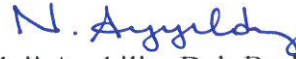
Tezi Hazırlayan

Tuğba ÖZKAYA FERAK



Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇİ



Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇİ danışmanlığında **Tuğba ÖZKAYA FERAİ** tarafından hazırlanan **“Baskılı Elektrokimyasal ELİZA (PRINTECELISA) Amperometrik Biyosensör İle Beta-kazomorfın-7 (BKM-7) Tayini Metodunun Geliştirilmesi”** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

09/01/ 2018

JÜRİ:

Danışman : Yrd. Doç. Dr Ebru Saatçi

Üye : Prof. Dr. Ahmet Ülgen

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kutay İçöz

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 16/01/2018 tarih ve 2015/03-08 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKKURT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübesinden faydalandığım Prof. Dr. Ahmet ÜLGEN'e ve Prof. Dr. Şaban PATAT'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Şehri ÇATALCA'ya da teşekkür ediyorum.

Her koşulda yanımda olan ve destekleriyle beni güçlü kılan aileme, sabrı ve sevgisiyle beni destekleyen eşim Mustafa FERAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarımda cihazların temininde destek olan İspanya, Dropsens ve mali destek sağlayan Ankara, BYS grup firmalarına teşekkür ederim.

Bu çalışma TÜBİTAK 1509 Uluslararası Sanayi Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamındaki 91358 numaralı ve “PRINTED ELECTROCHEMICAL ELISA, PRINTECELISA” başlıklı projesi kapsamında desteklenmiştir.

Tuğba ÖZKAYA FERAK

Kayseri, Ocak 2017

**BASKILI ELEKTROKİMYASAL ELİZA (PRINTECELISA)
AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRÜ İLE BETA-KAZOMORFİN-7 (BKM-7)
TAYİNİ TASARIMI**

Tuğba ÖZKAYA FERAK

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2017

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇİ

ÖZET

Biyosensörler, immobilize edilmiş biyolojik aktif bir bileşiğin, bir sinyal çevirici ve bir elektronik çoğaltıcı ile doğrudan birleştirildiği fonksiyonel sistemlerdir. Elektrokimyasal biyosensörler immünolojik ölçümlerde en çok kullanılanlarındandır. İmmunosensörler, antijen-antikor biyo-etkileşimi sürecinde enzimatik işaretler üzerinden elektrokimyasal ürünlerinin ölçülmesi prensibine dayanırlar. Enzimatik ürün elektrokimyasal bir dedektör tarafından ölçülebilen bir elektriksel sinyal oluşturarak antijen konsantrasyonunun ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Bu tip biyosensörler diğer biyosensörlerde ortaya çıkan çoğu dezavantajın üstesinden gelmişlerdir. Muameleye tabii tutulmamış örneklerden analit tayininde kullanılabilirler ve buna rağmen duyarlılıkları oldukça fazladır. Taşınabilir boyutlara getirilebilirler. Gıdadan sağlığa farklı alanlarda kullanılmaktadırlar.

Beta-kazomorfın-7 (BKM-7), A1 tip inek sütü olarak bilinen, sekansının belli bir bölgesinde Pro-His mutasyona uğramış inek sütünün enzimatik sindirimi sonucunda açığa çıkmaktadır. Opioid aktif peptitlerdir. Etkilerini bağısaktan emilerek vücuttaki opioid reseptörlere bağlanarak gösterirler. İnsan sağlığı üzerine etkileri büyüktür.

Bu çalışmada, amperometrik immunosensör temelli bir metotla, peynir suyunda BKM-7 tayini yapılmıştır. Çalışmada kullanılan Printed-ECELISA cihazı çoklu bir baskılı elektrot (SPE) sistemine sahiptir. BKM-7 tayini için öncelikle yarışmalı immun ölçüm metodu manyetik boncuk ve SPE'lerle kombine edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler, enzimatik işaret HRP ve enzimin elektroaktif substratı ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit) kullanılarak yapılmıştır. PrintECELISA protokolü olarak adlandırılan bu metotla peynir suyunda BKM-7 miktar tayini gerçekleştirilmiştir. İmmunosensör çalışma ölçüm aralığı 0.5-200 ng/ml olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amperometrik immunosensör, peynir altı suyu, beta-kazomorfın-7, baskılı elektrotlar, manyetik boncuklar

**DESIGN AND DETERMINATION OF BETA-CASOMORFIN (BCM-7) WITH
PRINTED ELECTROCHEMICAL AMPEROMETRIC ELISA
(PRINTECELISA)**

Tuğba ÖZKAYA FERAK

Erciyes University, Institute of Science

Graduate Thesis, January 2017

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ebru SAATÇI

ABSTRACT

Biosensors are functional systems in which an immobilized biologically active compound is directly coupled to a signal transducer and an electronic multiplier. Electrochemical biosensors are most widely used biosensors in immunological measurements. Immunosensors are based on the principle of measuring electrochemical products through enzymatic signals in the course of antigen-antibody bio-interactions. The enzymatic product allows the measurement of the antigen concentration by generating an electrical signal which can be measured by an electrochemical detector. Such biosensors come from many disadvantages that arise in other biosensors. They can be used to identify analytes from untreated samples and yet they are highly sensitive. They can be brought to portable dimensions and used in different areas such as food and medical measurements. Beta-casomorphin-7 (BCM-7), is cleaved by the enzymatic digestion from A1 type cow's milk that has undergone the Pro-His mutation in a certain region of its sequence. They are opioid active peptides. Their effects are demonstrated by binding to opioid receptors in the body. The effects of the peptides on human health is great.

In this study, an amperometric immunosensor-based method was used to determine BCM-7 in whey. The Printed-ECELISA device used in the study has a multiple printed electrode (SPE) system. For the BCM-7 assay, the competitive immunoassay method was first combined with magnetic beads and SPEs. Electrochemical measurements were done by using the enzymatic label HRP and its electroactive substrate ABTS (2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). BCM-7 quantity determination in whey was carried out with this method which is called as PrintECELISA protocol. The immunosensor linear measurement range for BCM-7 was found as 0.5-200 ng / ml.

Key words: Amperometric immunosensor, whey, beta-casomorphin-7, screen printed electrodes, magnetic beads

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvii
GİRİŞ	1

1.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Sütün Tanımı.....	4
1.1.1. İnek Sütünün Tanımı	4
1.1.2. Süt Proteinleri	5
1.1.2.1. Kazeinler.....	6
1.1.2.1.1. α -Kazein	8
1.1.2.1.2. κ -Kazein	9
1.1.2.1.3. β -Kazein	9
1.1.2.2. Süt Proteinlerinde Polimorfizm	9
1.1.2.2.1. β -kazeinin polimorfizmi	10
1.1.2.2.2. β -Kazeinlerden β -Kazomorfın Salınımı.....	12
1.2. Peynirde Biyoaktif Peptitler	13
1.2.1.Biyoaktif Peptitler	13
1.2.2. Peynirde Biyoaktif Peptit Oluşumu.....	14

1.2.2.1. Peynirde β -Kazomorfin-7.....	15
1.2.3. Biyoaktif Peptitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	16
1.2.3.1. β -Kazomorfinlerin Diyabet Hastalığı ile İlişkisi.....	16
1.2.3.2. Sindirim Sistemi Üzerine Etkileri.....	17
1.2.3.3. β -Kazomorfinler ve Ani Bebek Ölüm Sendromu (SIDS) İlişkisi.....	17
1.2.3.4. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri.....	18
1.2.3.5. Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	19
1.3. Biyoaktif Peptitlerin Tayini	20
1.3.1. Biyoaktif Peptitlerin İmmünolojik Yöntemler ile Tayini	20
1.3.1.1. Enzim-Bağımlı İmmüno Ölçümler (ELİZA).....	21
1.3.1.1.1. ELİZA Metodunun Çeşitleri ve Prensipleri	21
1.4. ELEKTROKİMYA.....	22
1.4.1. Dönüşümlü Voltametri.....	23
1.5. BİYOSENSÖR	24
1.5.1. Biyosensörler	24
1.5.2.Biyosensörlerin Tarihsel Gelişimi.....	25
1.5.3. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu.....	26
1.5.4.Biyobileşenler (Biyokomponentler, Biyoreseptörler).....	28
1.5.5. Fiziksel Bileşenler	29
1.6. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	30
1.6.1. Biyobileşen (Biyoreseptör) Materyalleri Temel Alınarak Yapılan Sınıflandırma	30
1.6.1.1. Enzim Bazlı Biyosensörler	30
1.6.1.2.Hücre Bazlı Biyosensörler.....	31
1.6.1.3.Antikor Bazlı Biyosensörler (İmmunosensörler)	31
1.6.1.4.Mikrobiyal Biyosensörler.....	31
1.6.1.5.DNA Bazlı Biyosensörler.....	31

1.6.1.6.Ribozim Bazlı Biyosensörler	32
1.6.1.7.Doku ve Organel Temelli Biyosensörler	32
1.6.2. Sinyal İletici Sistem (Transdüser) Materyalleri Temel Alınarak Yapılan Sınıflandırma	32
1.6.2.1 Kimyasal Biyosensörler.....	32
1.6.2.2. Elektrokimyasal Biyosensörler	33
1.6.2.3. Amperometrik Biyosensörler.....	33
1.6.2.4. Potansiyometrik Biyosensörler	35
1.6.2.5. Optik Biyosensörler.....	35
1.6.2.6. Kolorimetrik Biyosensörler.....	35
1.6.2.7. Termal Biyosensörler	36
1.6.2.8. Piezoelektrik Biyosensörler.....	36
1.7. Biyosensörlerin Genel Uygulamaları.....	36
1.8. Enzim Temelli Biyosensörler	37
1.8.1. Amperometrik Biyosensörler Jenerasyonları	38
1.8.2. Manyetik Boncuklar ve Nanopartiküller	40
1.8.3. Baskılı Elektrotlar (Screen-Printed Electrodes: SPE)	42

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneylerde Kullanılan Materyaller	44
2.1.1. Kimyasallar	44
2.1.2. Araç, Gereç ve Cihazlar	44
2.2. Yöntemler	46
2.2.1. Biotin-BKM-7 Spektrofotometrik Direk ELİZA Çalışma Metodu.....	46
2.2.2.Yarışmalı BKM-7 ELİZA Metodu	47
2.3. Baskılı Elektrokimyasal ELİZA (PrintECCELISA)	49
2.3.1. Dönüşümlü Voltametri.....	49

2.3.2. Manyetik Boncuklar (MBs) ile Amperometrik Direk Biotin-BKM-7 Biyosensör Tayin Metodu.....	49
2.3.3. Direk ECELISA ile Amperometrik BKM-7 Biyosensör Optimizasyonu.....	51
2.3.3.1. Farklı Çalışma Tamponu Denemeleri	51
2.3.3.2. Uygulama Potansiyeli Optimizasyonu	52
2.3.3.3. Streptavidin Kaplı Manyetik Boncuk Konsantrasyonu Denemeleri.....	52
2.3.3.4. HRP Substratları ABTS ve H₂O₂'nin Amperometrik Optimizasyonu.....	52
2.3.3.5. HRP Aktivitesi Okuma Süresi Tespiti	52
2.3.3.6. Poliklonal BKM-7 Antikor Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	52
2.3.3.7. Avidin-HRP Konsantrasyonu Optimizasyonu	53
2.4 Optimize Edilmiş Koşullar Altında 96x DRP SPE Elektrotlarda BKM-7 Biyosensör Ölçümleri.....	53
2.4.1.Yarışmalı BKM-7 ECELISA Ölçümleri.....	53
2.4.1.1. 8x DRP SPE Üzerinde Yarışmalı BKM-7 ECELISA Metodu.....	54
2.4.1.2. 96x DRP SPE Üzerinde Yarışmalı BKM-7 ECELISA Metodu.....	56
2.5. Geliştirilen Amperometrik Biyosensör ile Peynir Altı Suyu Örneklerinde BKM-7 Tayini	57
2.5.1. Peynir Altı Suyuna Peptit Salınımının Sağlanması.....	57
2.5.2. Peynir Suyundan Peptit Eldesi	57
2.5.3. ECELISA Yöntemi ile Peynir Altı Suyu Örneklerinden BKM-7 Tayini Prosedürü	57
2.6. İstatistiksel Analiz	59

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Spektrofotometrik ELİZA Çalışma Metodu Bulguları	60
3.1.1. Biotin-BKM-7 Direk ELİZA Sonuçları.....	60
3.1.2. Yarışmalı BKM-7 ELİZA Sonuçları	61

3.2. BKM-7 Elektrokimyasal ELİZA (ECELISA) Ölçüm Metodu Sonuçları	63
3.2.1. Dönüşümlü Voltametri.....	63
3.2.2. Direk ECELISA ile Amperometrik BKM-7 Biyosensör Optimizasyonu.....	63
3.2.2.1. Farklı Tampon Denemeleri Sonuçları	63
3.2.2.2. Uygulama Potansiyeli Sonuçları	64
3.2.2.3. Streptavidin Kaplı Manyetik Boncuk Konsantrasyonu Optimizasyon Sonuçları	64
3.2.2.4. HRP Substratı ABTS'in Amperometrik Optimizasyon Sonuçları	65
3.2.2.5. HRP Aktivitesi Okuma Süresi Tespiti.....	66
3.2.2.6. Poliklonal BKM-7 Antikor Konsantrasyonu Optimizasyon Sonuçları	66
3.2.2.7. Avidin-HRP Konsantrasyonu Optimizasyon Sonuçları.....	67
3.2.2.8. Optimizasyonlardan Sonra Standart Grafikler Üzerinden Uygulama Potansiyeli Farkı Sonuçları	68
3.2.2.9. Optimize Edilmiş Koşullar Altında 96x DRP SPE Elektrotlarda Biotin-BKM-7 Direk ECELISA Sonuçları	69
3.3.Yarışmalı BKM-7 ECELİSA Ölçümleri	70
3.3.1. DRP 8x SPE'ler ile Elde Edilen BKM-7 Yarışmalı İmmunosensör Sonuçları	70
3.3.2. 96x SPE Dropsens Elektrotlar Kullanılarak Çalışılan Yarışmalı BKM-7 Biyosensör Sonuçları.....	72
3.4.Peynir Altı Suyu BKM-7 Yarışmalı ECELISA Metodu Optimizasyonu:.....	73

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma	75
4.2. Sonuç ve Öneriler	84
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	99

KISALTMALAR ve SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>
SPCEs	: Ekran Baskılı Elektrotlar
MBs	:Manyetik Boncuklar
α -Kazein	: Alfa-Kazein
β -Kazein	: Beta-Kazein
κ -Kazein	: Kappa-Kazein
BKM-7	: Beta-Kazomorfın-7
CM	: Kazomorfın
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
GI	: Gastrointestinal
BLG	: Beta-Laktoglobulin
SIDS	: Sudden Infant Death Syndrome (Ani Bebek Ölüm Sendromu)
TS	: Türk Standartları
CMP	: Kazeinomakropeptit
ACE	: Angiotensin I-Dönüştürücü Enzim
CPP	: Kazeinofosfopeptitler
GIS	: Gastrointestinal Sistem
UV	: Ultra Viyole
UV-Vis	: Ultra Viyole-Visible
ELİZA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Enzim İlintili İmmünolojik Test)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit

RNA	: Ribonükleik Asit
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
GLUT	: Glucose Transporter (Glukoz Taşıyıcısı)
LPS	: Lipopolisakkarit
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell (Periferik Kan Mononükleer Hücreleri)
KKH	: Kroner Kalp Hastalıkları
SYA	: Sature Yağ Asitleri
AD(H)D	: Attention Deficit (Hyperactivity) Disorder (Dikkat Eksikliği (Hiperaktivite))
RT-PCR	: Real Time- Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
BSA	: Bovine Serum Albumin
HRP	: Horseradish Peroxidase
KHL	: Keyhole Limpet Hemocyanin
ABTS	: 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid)
TMB	: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
MS	: Multiple Skleroz
DPIV	: Dipeptidil Peptidaz 4
EİA	: Enzyme İmmunoassay
RİA	: Radio İmmunoassay
EDC	: Etilen Bikarbonat

TNF	: Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
IL	: İnter Lökin
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
mM	: Milimolar
MBs	: Manyetik Boncuklar
M	: Molar
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
l	: Litre
OP	: Organik fosfat
g	: Gram

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. α -kazein, β -kazein ve κ -kazein'in protein konsantrasyon aralığı.	7
Tablo 1.2. Süt proteinlerinin allelik varyasyonları	10
Tablo 1.3. Farklı immobilizasyon yöntemleri.	25
Tablo 1.4. Biyosensör bileşenlerinin içeriği.....	30
Tablo 1.5. Biyosensörlerin avantaj ve dezavantajları.	37
Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan araç, gereçler ve cihazlar.	44
Tablo 3.1. 8X ve 96X LİK Elektrotlarda 6 farklı peynir altı suyuna ait BKM-7 konsantrasyon sonuçları	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Sütün ana bileşenleri.	5
Şekil 1.2. İnek sütü bileşimi.	6
Şekil 1.3. Kazein Misellerinin Yapısı.	8
Şekil 1.4. A2 tip β -kazein'den inek sütündeki β -kazein'lerin oluşumu.....	11
Şekil 1.5. A1 ve A2 β -kazein proteinlerinde 67. pozisyonadaki aminoasit farklılığını gösteren protein zinciri.	12
Şekil 1.6. β -kazomorfın-7'nin kimyasal yapısı	13
Şekil 1.7. β -kazomorfın-7'nin serbest bırakılması	13
Şekil 1.8. Dönüşümlü voltamogram	23
Şekil 1.9. Glikoz tespiti için bir Clark enzim elektrotu	26
Şekil 1. 10. Bir biyosensörün şematik gösterimi.	27
Şekil 1.11. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi.....	28
Şekil 1.12. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi	33
Şekil 1.13 Amperometrik esaslı bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi	34
Şekil 1.14. Bir enzim elektrotunun temel kısımları.	38
Şekil 1.15. Amperometrik enzim elektrotu jenerasyonları a) I. Nesil Amperometrik elektrotlar, b) II. Nesil Amperometrik elektrotlar, c) III. Nesil Amperometrik elektrotlar	39
Şekil 1.16. Manyetik partiküllerin şematik gösterimi (A), fonsiyonel gruplarla aktivasyon (B) ve konjuge biyolojik moleküler (C)	41
Şekil 1.17. Manyetik boncukların modifikasyonu ve baskılı elektrotlar üzerinde biyosensör ölçümleri.	42
Şekil 1.18. SPE yapısı.	43
Şekil 2.1. Baskılı ECELISA Sistemi: Potansiyostat, elektrot bağlantıları, 8x elektrot ve bilgisayar bağlantısı	45
Şekil 2.2. Deneylerde kullanılan santrifüj cihazı.....	45
Şekil 2.3. Çalkalamalı vorteks.....	46
Şekil 2.4. Manyetik boncukları toplama ve yıkamada kullanılan magnet.	46

Şekil 2. 5. Biotin-BKM-7 Direk ELİZA çalışma metodu diyagramı	47
Şekil 2.6. Yarışmalı BKM-7 metodunun şematik gösterimi.....	48
Şekil 2.7.Yarışmalı BKM-7 metodu diyagramı	48
Şekil 2.8. Yarışmalı BKM-7 metodunun şematik gösterimi.....	50
Şekil 2.9. Eppendorf içinde dağınık ve 16'lı magnet üzerinde toplanmış modifiye manyetik partiküller.	50
Şekil 2.10. Dropsens 8x DRP amperometrik biyosensör elektrotu.	51
Şekil 2.11. Dropsens 96x DRP amperometrik biyosensör elektrotu ve potansiyostat konnektörü.....	51
Şekil 2.12. Yarışmalı ECELISA uygulama protokolü şematik gösterimi	54
Şekil:2.13. 8x DRP SPE'ler ile okumaları gerçekleştirilen yarışmalı ECELISA BKM-7 biyosensörü metodunun çalışma diyagramı	55
Şekil:2.14. 96x DRP SPE'ler ile okumaları gerçekleştirilen yarışmalı ECELISA BKM-7 biyosensörü metodunun çalışma diyagramı	57
Şekil:2.15. 8x ve 96x DRP SPE'ler ile okumaları gerçekleştirilen yarışmalı ECELISA BKM-7 örnek konsantrasyonları metot çalışma diyagramı.....	58
Şekil 3.1. Direk ELİSA BKM-7 antikor konsantrasyonları değişim grafiği.....	61
Şekil 3.2. BKM-7 Direk ELİSA standart grafiği.....	61
Şekil 3.3. Yarışmalı BKM-7 ELIZA'sı plakasının çalışma sonrası görünümü.....	62
Şekil 3.4.BKM-7 yarışmalı ELİSA için standart log/logit grafiği.	62
Şekil 3.5. ABTS dönüşümlü voltametri voltamogramı.....	63
Şekil 3.6. Çalışma tamponları karşılaştırma grafiği.	64
Şekil 3.7. Uygulama potansiyeli voltametri grafiği.....	64
Şekil 3.8. Çalışma koşullarında manyetik boncuk miktarı optimizasyon grafiği.....	65
Şekil 3.9. ABTS ve H ₂ O ₂ optimum konsantrasyonları belirleme grafiği.....	65
Şekil 3.10. HRP aktivitesi okuma süresi tespiti.	66
Şekil 3.11. Poliklonal BKM-7 antikor konsantrasyonu optimizasyon grafiği	67
Şekil 3.12. Avidin-HRP konsantrasyonları optimizasyon grafiği.	67

Şekil 3.13. Uygulama potansiyeli farkı çalışma grafiği.....	68
Şekil 3.14. Optimize edilmiş koşullar altında Biotinlenmiş BKM-7 direk ECELISA standart grafiği	69
Şekil 3.15. DRP 8X'lik elektrot kullanılarak elde edilen biotin-BKM-7 standart eğrisi amperometrik voltamogram görünümü.	69
Şekil 3.17. DRP 8x elektrotta BKM-7 tayini için tasarlanan edilen manyetik boncuk temelli yarışmalı ECELISA metodu için elde edilen akıma karşı konsantrasyon 4-parameter logistic grafiği.....	71
Şekil 3.18. DRP 8x'lik elektrotta BKM-7 tayini için tasarlanan edilen manyetik boncuk temelli yarışmalı ECELISA metodu için elde edilen log/logit grafiği.	71
Şekil 3.19. 96x SPE Dropsens elektrotta BKM-7 tayini için dizayn edilen manyetik boncuk temelli yarışmalı ECELISA metodu için elde edilen akıma karşı konsantrasyon grafiği	72
Şekil 3.20. 96x Dropsens SPE elektrotta BKM-7 tayini için dizayn edilen manyetik boncuk temelli yarışmalı ECELISA metodu için elde edilen log/logit grafiği	73

GİRİŞ

Biyosensörler, biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş sensör elementinin, bir fizikokimyasal çevirici veya transducer ile bütünleştirilmesiyle oluşan kompakt analitik araçlardır [1]. Biyolojik algılayıcı elementin seçiciliği ve hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak sinyal üretirler. Bu sinyal, proton konsantrasyonunda ki değişimden, amonyak veya oksijen gibi gazların salınması ya da yükseltgenmesinden, ışık emisyonundan, absorpsiyon ya da reflektansdan, ısı emisyonundan veya kütle değişimi gibi değişimlerden kaynaklanmaktadır [2]. Sinyal, transducer yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışığın absorpsiyonu ya da elektrokimyasal, termal, optik olarak ya da piezoelektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir forma dönüştürülür. Sinyal ayrıca ileri ki analizler için güçlendirilebilir, işlenebilir veya depolanabilir. Prensipde herhangi bir reseptör herhangi bir çevirici ile birleştirilip işleyen bir biyosensör üretilebilir [3].

Elektrokimyasal reaksiyonlarda, çoğu analitlerin redoks çiftleri olmadığından dolayı doğrudan olarak analiz edilebilecek az miktarda direk uygulama vardır. Bu yüzden algılayıcı elektrot üzerinde analitin elektrokimyasal reaksiyonu için elektrokimyasal aktif etiketler (doğrudan veya enzimatik reaksiyon sonucu elektroaktif ürün olarak) gerekli olmaktadır. Oksijen ve hidrojen peroksit (H_2O_2) elektrotları en popüler olanlarındandır [4].

Elektrokimyasal ölçümlerden biri olan amperometri, belirli (tanımlı) potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır. Amperometrik biyosensörlerde akım şiddeti, çalışma elektrotunda yükseltgenen veya indirgenen elektro aktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Referans elektrot olarak görev yapan ikinci bir elektrot vasıtasıyla, akım şiddetinden analiz edilecek türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanılmaktadır [5]. Çalışmamızda bu yöntem kullanılarak A1 tip sütlerden açığa çıkan β -kazomorfine-7 (BKM-7) peptidi ölçümü peynir suyunda yapılmıştır.

Peynir, sütün peynir mayası veya zararsız organik asitlerin etkisiyle pıhtılaştırılması, değişik şekillerde işlenmesi ve bu arada süzülmesi, şekillendirilmesi, tuzlanması, bazen tat ve koku verici zararsız maddeler katılması ve çeşitli süre ve sıcaklıklarda olgunlaştırılması sonucunda elde edilen besin değeri yüksek bir süt ürünüdür [6]. Sütün bileşimindeki protein, yağ, mineral maddeler özellikle kalsiyum ve fosfor minerallerini ve özellikle yağda eriyen A, D, E, K vitaminleri ve suda eriyen B₂ vitamini başta olmak üzere vitaminleri yoğunlaştırılmış bir şekilde yapısında bulunduran peynir, beslenme değerinin üstün olması ve zevkle tüketilmesinden dolayı, toplumun her yaş grubunun beslenmesinde büyük önem taşımaktadır [7]. Her peynir çeşidinin kendine özgü renk, koku, tat, yapı, gözenek, kabuk gibi özelliklerinin oluşmasında kullanılan hammadde, uygulanan teknik ve olgunlaşma koşulları önemli rol oynamaktadır. Olgunlaşma, çeşitli enzimlerin ve mikroorganizmaların etkisiyle çok karmaşık biyokimyasal reaksiyonların gerçekleştiği bir süreçtir [8].

Peynirler birer protein jelidirler. Bu nedenle süt proteinleri bu ürünlerin oluşumunda temel önem arz ederler [9]. İnek sütü gelişmiş toplumların beslenmesinin büyük kısmını oluşturur ve litrede ortalama 32 gr protein içermektedir [10]. Süt proteinlerinin içinde bulunan kazein genel olarak en önemli süt proteini olarak bilinmektedirler. Kazeinler inek sütündeki total proteinin % 82'sini oluşturmaktadır [11].

Sütün esas proteinleri olarak bilinen kazeinler, sütün asit ile reaksiyonundan sonra çökmeyen kısmıdır [12]. Bu proteinler kovalent olmayan bağlarla bir arada tutulur ve 4 farklı (α^1 -, α^2 -, β - ve κ) kazeinden oluşur. A1 tip (Pro-His mutasyon) süt β -kazeinin gastrointestinal sindirimi sonucunda BKM-7 oluşmaktadır. A2 tip β -kazeinin parçalanması sonucunda BKM-7 açığa çıkmamaktadır [13]. β -kazomorfine morfine benzer opioid agonist etkilerini vücuttaki opioid reseptörlere bağlanarak göstermektedirler.

Önceleri β -kazomorfine-7'nin tayininde, sütün in vitro enzimatik sindirim sonucu açığa çıkan peptitleri göstermek amacıyla spektral karşılaştırma, second order derivative spectroscopy, HPLC, RT-PCR, ELİZA ve nanoelektrosprey ile birlikte iyon-trap-mass spektrometresi yöntemleri kullanılmıştır [14, 15, 16, 17]. Hızlı ölçüm yöntemleri olan biyosensörler son dönem çalışmalarıdır.

Bu alışmada, Printed-ECELISA cihazı ile peynir suyunda BKM-7 tayini için manyetik boncuklara dayalı elektrokimyasal immunosensör kit geliştirildi. Geliştirilen yarışmalı immun ölçüme dayalı immunosensör, multipleks bir elektronik donanıma sahip bir sistemde oluşturuldu. Ölçümler için baskılı multipleks elektrotlar (8x ve 96x SPE'ler) kullanıldı. Sistem, diğerk sistemlere göre yüksek duyarlılıkta, multipleks analiz yapabilme yeteneğinde ve multipleks elektronik bir tasarıma sahiptir. Elektrokimyasal ve optik deteksiyon metotları arasındaki boşluğudolduran, yenilikçi bir akım sağlayan güçlü bir analitik araçtır. Bu immunosensör tasarımıyla BKM-7 tayini için yenilikçi bir ölçüm tekniğigeliştirilmiştir.

1.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

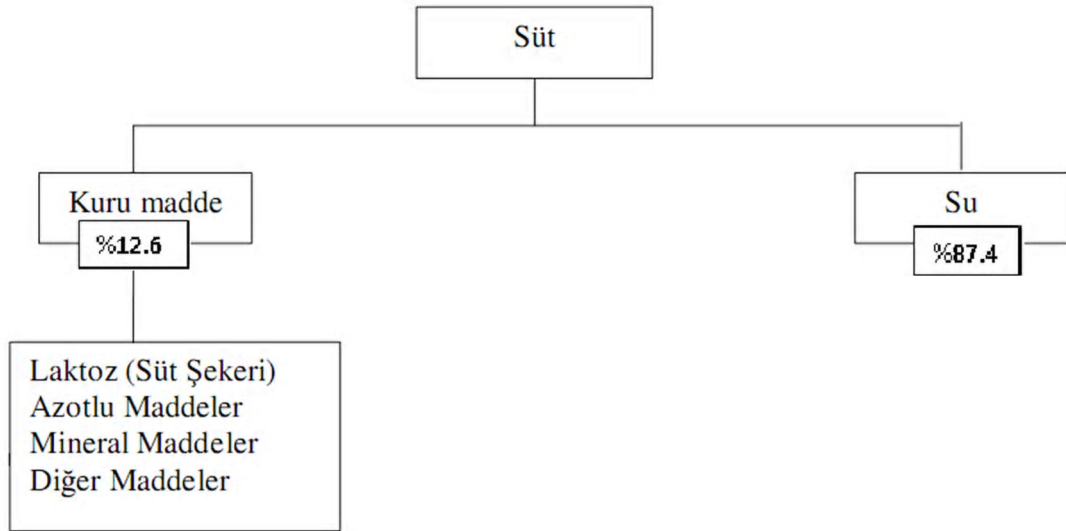
1.1. Sütün Tanımı

Süt; inek, koyun, keçi ve mandaların meme bezlerinden salgılanan, kendine özgü tat ve kıvamda olan, içine başka maddeler karıştırılmamış, içinden herhangi bir maddesi alınmamış, beyaz veya krem renkli sıvı maddedir [18]. Süt, içerdiği protein, laktoz, mineral maddeler, vitamin ve yağ yönünden oldukça zengin bir besin maddesidir. Süt proteini olan kazein ile süt karbonhidratı olan laktozun doğada sadece sütte bulunması sütün değerini daha da arttırmaktadır. Sütün içermiş olduğu esansiyel aminoasitler, galaktoz ve kalsiyum gibi bileşenlerin vücutta gelişmeyi olumlu yönde etkilediği bilinmektedir [19].

Teknolojik ve ekonomik açıdan incelendiğinde, sütün kuru maddesi büyük önem taşır. Kuru madde, sütün su hariç diğer maddelerinin toplamını oluşturmaktadır [20]. Çoğu zaman kuru madde; yağ ve yağsız kuru madde olarak ele alınmaktadır. Yağsız kuru madde denildiği zaman ise, sütün ana besin öğeleri, yani yağın dışındaki süt şekeri (laktoz), azotlu maddeler, mineral maddeler ve sütün diğer maddeleri anlaşılmaktadır [12]. Sütün yağsız kuru madde oranı oldukça sabittir ve ancak %8 ile 10 arasında değişir. En az olduğu dönem yaz başlarına rastlar. Sonbahar sonu ve kış başlarında ise en yüksek seviyeye ulaşmış olur [7].

1.1.1. İnek Sütünün Tanımı

Başta içme sütü olmak üzere birçok süt mamulünün işlenmesine uygun olan ve bu nedenle süt teknolojisi için önem taşıyan inek sütünün bileşimine ait ortalama değerler ve söz konusu bileşenlerin kuru madde içerisindeki oranları Şekil 1.1’de gösterilmektedir[6].

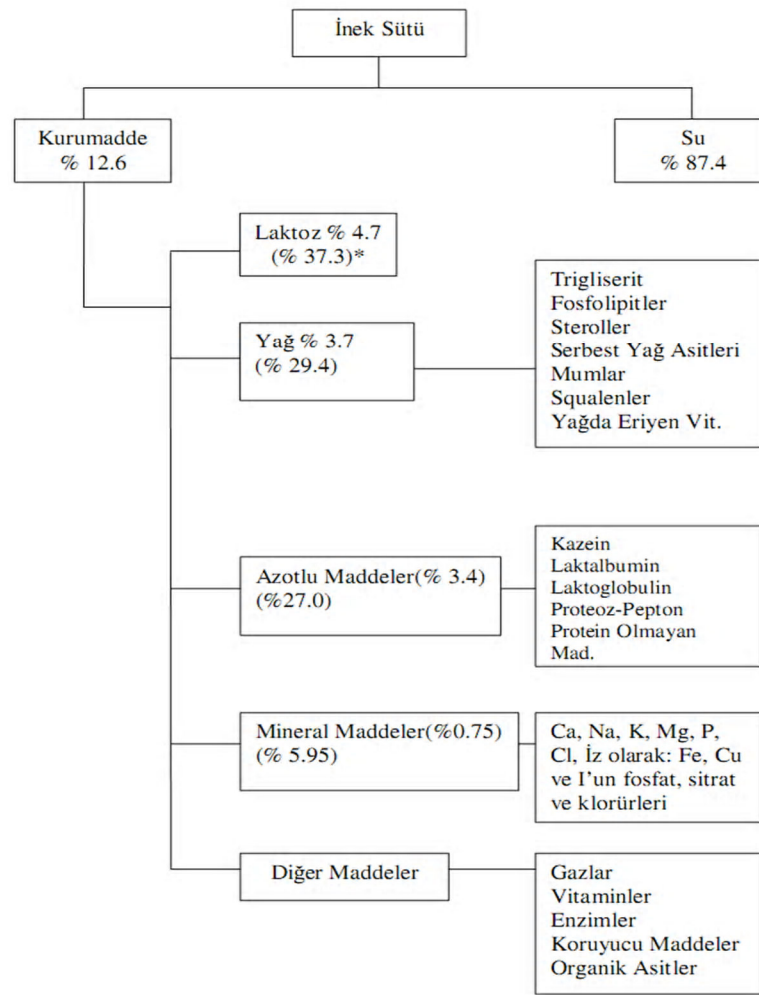


Şekil 1.1. Sütün ana bileşenleri [6].

Kuru maddenin yaklaşık %27'si azotlu maddelerden ve yine yaklaşık %29' u süt yağından oluşmaktadır. Kuru maddedeki yaklaşık %37'lik değeri ile laktoz en büyük paya sahiptir. Mineral maddeler ise toplam kuru maddeler içerisinde %5.95'lik bir oranda bulunmaktadır. İnek sütü bileşimindeki diğer maddeler, miktar açısından önemli değildir. Ancak fonksiyonları açısından büyük önem arz eder [7]. İnek sütünün bileşimi başta ırk olmak üzere çeşitli faktörlerin etkisi altında değişiklik gösterir. İnek sütünün kuru maddesi %10.5-14.5, yağ oranı % 2.5-6.0, laktoz oranı % 3.6-5.5, protein oranı % 2.9-5.0 ve mineral madde oranı % 0.6-0.9 arasında değişmektedir [6].

1.1.2. Süt Proteinleri

İnek sütü gelişmiş toplumların beslenmesinde büyük kısmını oluşturmaktadır ve litrede ortalama 32 gr protein içermektedir [10]. Süt proteinlerinin içinde bulunan kazein genel olarak en önemli süt proteini olarak bilinmektedir. Kazeinler inek sütündeki total proteinin %82'sini oluşturmaktadır ve geri kalan %18'i whey proteinleri de denilen serum proteinleridir [7]. Peynirde birer protein jelidir. Bu nedenle süt proteinleri bu ürünlerin oluşumunda temel önem arz etmektedir [9].



* Parantez içindeki rakamlar, kurumadde içerisindeki oranlarını göstermektedir.

Şekil 1.2. İnek sütü bileşimi [6].

1.1.2.1. Kazeinler

Sütün esas proteini olarak bilinen kazeinler, sütün asit ile reaksiyonundan sonra çökmeyen kısımdır [8]. Memeli epitelyum hücreleri tarafından üretilmektedirler [7]. Kazeinler nicelik bakımından en önemli süt protein bileşenlerini oluşturmaktadır [10]. Yapılarında karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N), kükürt (S) ve fosfor (P) bulunmaktadır [21]. Kazein proteini, süt içerisinde 30-300 nm çapında partiküller halinde yüksek miktarda bulunur [11]. Misel olarak bilinen bu protein kompleksi kovalent olmayan bağlarla birarada tutulan ve sütte son derece kararlı dağılım gösteren 4 farklı kazeinden (α 1-, α 2-, β - ve κ - kazeinler) oluşmaktadır. Klasik peynir yapım sürecinde enzim-tetikli süt pıhtılaşma basamağından sonra oluşan lor (kesmik) kazein fraksiyonu sonucudur [10]. Kazein inek sütünde %2.63 oranında kendini göstermektedir

[9]. Veloso ve arkadaşları, inek sütünde ters-faz HPLC ile belirlenen kazein konsantrasyonunun ortalama 0.377–3.76 mg/ml ve β -kazeinin konsantrasyonunun ise 0.151–1.51 mg/ml arasında olduğunu belirtmişlerdir (Tablo 1.1) [10].

Tablo 1.1. α -kazein, β -kazein ve κ -kazein'in protein konsantrasyon aralığı [9].

Kazeinler	Konsantrasyon Aralığı (mg/ml)
Bütün Kazein	0.377 – 3.76
κ -Kazein	0.038 – 0.377
α -Kazein	0.188 – 1.88
β -Kazein	0.151 – 1.51

Kazeinler hidrofobik bir yapıya sahiptirler. Bu yüzden kazein miselleri sütte bir süspansiyon halinde bulunmaktadır. Hidrofobik olmaları, kazeinlerin suda ve nötral tuz çözeltilerinde çözünmemelerine, sodyum oksalat ve sodyum asetat gibi tuz çözeltilerinde ve bazik çözeltilerde ise çözünmelerine sebep oluşturmaktadır. Kazeinin yapısında çokça etkileşime girmemiş prolin peptitleri bulunur [22].

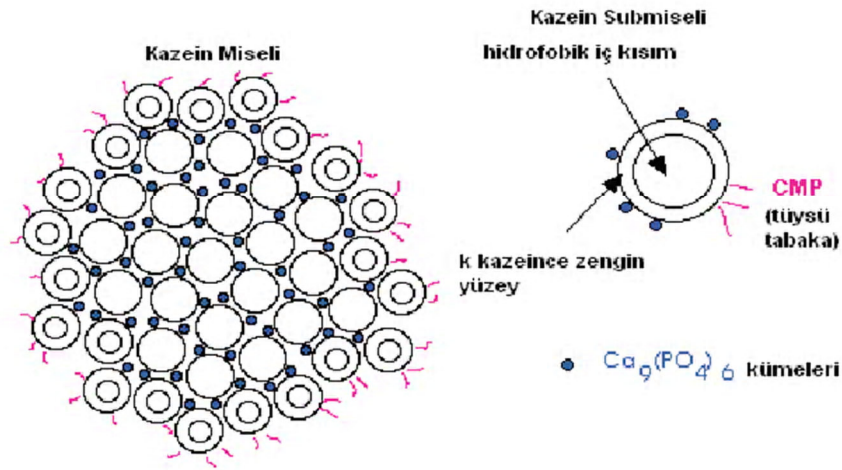
Taze sütte kazeinler stabil durumdadırlar ve net negatif elektriksel yük dağılımına sahip olur. Misellerin yüzeyindeki hidrofilik C-terminal ucu ayrılırsa (örneğin rennet ile) miseller çözünürlüğünü kaybederek kümeleşmeye başlar ve kazein pıhtısını oluşturmaktadır. Hidrofil kısımlar uzaklaşınca su yapıyı terk etmeye başlar. Negatif yükte azalma olur ve çekim kuvvetleri etki etmeye başlar. Biri kalsiyumun aktif olduğu tuz tipinde ve ikincisi de hidrofobik tipte olan yeni bağlar oluşmaktadır. Bu bağlar suyun uzaklaşmasını artırır ve yapı sonuçta yoğun bir pıhtıya dönüşmektedir. Kazein misellerinin bu yapısı Şekil 1.3'de verilmektedir [6].

Asitlik artışıyla (+) yükün artması, misellerden koloidal kalsiyum fosfatın ayrılmasına ve yerine H^+ gelmesine neden olmaktadır. Miselde (–) yük azalır. İzoelektrik noktaya kadar devam ederse pıhtılaşma oluşturmaktadır[24].

Serum proteinleri: Süt proteinlerinin %20'sini oluştururlar. Albuminler (α -laktalbumin, β -laktoglobulin ve serum albumini), globulinler (euglobulin, pseudoglobulin), proteoz-peptonlarından oluşmaktadır. Serum proteinlerinin sekonder ve tersiyer yapıları ısıya

duyarlı kimyasal bağlar ile stabilize edildiğinden 80-85°C'lerin üzerinde ısı uygulaması sonucunda bu bağlar kırılmakta ve serum proteinlerinin denatürasyonu gerçekleştirmiş olur. Serum proteinlerinin denatürasyonu ile serum proteinlerinin su tutma kapasitesi fazla olduğundan pıhtının bağlayabildiği su miktarının artışı sağlanır ve bu olayla yoğurt oluşumunda tekstürün daha iyi olması, su salmanın önlenmesi sağlanılmaktadır. Isıl işlemin etkisiyle serum proteinleri önce kendi aralarında, ardından da kazein miselleri ile (özellikle β -laktoglobulin ile κ -kazein arasında) interaksiyon meydana gelmektedir [24].

Kazein Miselleri:



Şekil 1.3. Kazein Misellerinin Yapısı [24].

1.1.2.1.1. α -Kazein

Tipik bir fosfoprotein olup, kalsiyuma karşı son derece hassastır. Her 100 g' da 7.47 g prolin içermektedir [12]. α s1- ve α s2- kazein olmak üzere iki farklı genetik varyanta sahiptir. α s1-kazein toplam kazein içinde miktar açısından en büyük orana sahip kazein fraksiyonu sonucudur. Diğer kazein fraksiyonları gibi prolin bakımından zenginlik arz eder. Bünyesinde 199 aminoasit içerir. α s2-Kazein ise 207 amino asite sahip olmaktadır [12]. α s2-Kazein bağlı fosfat gruplarının sayıca farklı olduğu beş proteinden oluşmaktadır [7].

1.1.2.1.2. κ -Kazein

Kazein misellerinin en kararlı komponenti olup, bir glikoproteindir. κ -Kazein kalsiyuma karşı herhangi bir hassasiyete neden olmaz. Diğer bir ifadeyle, κ -kazeine kalsiyum iyonları ilave edildiği zaman κ -kazein berrak bir halde dururken, α s-kazein kalsiyum iyonu ile tepkimeye girerek çok zor çözünen bir çökelti oluşturmaktadır. Fakat κ -kazeinin yüksek prolin içeriği (her 100 g' da 17 g) ve düşük fosfor içeriği alkolde yüksek çözünürlük sağlamış olur [13].

1.1.2.1.3. β -Kazein

β -Kazein α -s1-kazein'den sonra ikinci en çok bulunan kazeindir. Çökelek oluşumu için esastır ve misellerin yüzey özelliklerini belirlemede önem arz eder [12]. β -Kazein inek sütünde bulunan 209 amino asitin tekli polipeptit zincirinden oluştuğu büyük kazein fraksiyonu olmaktadır [23].

1.1.2.2. Süt Proteinlerinde Polimorfizm

Süt proteinlerinin kodominant Mendel kalıtımı gösterdiği saptanmıştır. Süt proteinin genetik varyantları birkaç aminoasitin yer değiştirmesi bakımından birbirlerinden fark oluşturmaktadır [25]. Bu genlerin pek çoğu haritalanmış ve dizileri bilinmektedir. Günümüzde süt proteinleri bakımından polimorfizmlerin gerek protein gerekse DNA düzeyinde saptanabildiği belirtilmiş ve süt proteinlerindeki bu polimorfizmlerden bazılarının süt verimini, kompozisyonunu, misel organizasyonunu, pıhtılaşma özelliklerini ve sütün peynir verimini etkilediği gösterilmektedir [8].

Dünyanın farklı bölgelerinden farklı hayvanlardaki süt protein polimorfizmi üzerine yapılan çalışmaların temel amacı şunlardır:

- (1) Süt proteinin evrimsel tarihini belirlemek,
- (2) Farklı türler ya da soylar arasındaki ilişkiyi doğrulamak,
- (3) Belirli hayvan populasyonları için zamanında ve aralıklarla olan değişiklikleri gözlemlemek,

(4) Genetik varyantlar, süt özellikleri (süt üretimi, süt protein içeriği, süt yağ içeriği, peynir üretimi ve kalitesi), üretim etkinliği ve hayvanın adaptasyon kapasitesi arasındaki ilişkileri açığa vurmaktır [25].

Altı büyük süt protein geninin hepsinde, genetik varyant denilen, otozomal ve kodominant alleller olmaktadır [26]. Bütün sütler aynı değildir ve farklı ülkelerden alınan sütler süt protein varyantlarının kompozisyonunda kayda değer değişiklik gösterebilir. Süt protein moleküllerindeki farklılıklar seperasyona (ayırma) ve elektroforez ile farklı varyantların algılanmasına izin vermektedir [27]. Proteinlerde aminoasit değişikliklerine sebep olan ilişkin genlerdeki polimorfik bölgeler göz önüne alınırsa, süt proteinlerinin genetik varyantları (allelık varyasyonları) Tablo 1.2.'de gösterilmektedir [28].

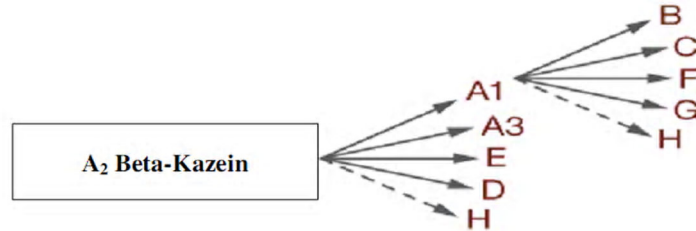
Tablo 1.2. Süt proteinlerinin allelik varyasyonları [28]

Süt Proteinleri	Allelik Varyasyonlar
α_{s1} -Kazein	A, B, C, D, F
α_{s2} -Kazein	A, D
β -Kazein	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B, C, E
κ -Kazein	A, B, C, E
α -Laktoglobulin	A, B
β -Laktoglobulin	A, B, C, D, H, W, X

1.1.2.2.1. β -kazeinin polimorfizmi

Diğer minör alleller de bulunmasına rağmen A1 ve A2 genetik varyantları sütü sağılan büyükbaş hayvanlarda en yaygın β -kazein allelleridir (Şekil 1.4) [25]. İnekler A1 ve A2 β -kazein alleli için homojen (A1A1 ve A2A2) ya da heterojen (A2A1) gen taşıyabilir. Bu eş baskınlık ile birlikte böylece, bir allel diğerini ezemez yani bir inek sütünde en çok iki β -kazein tipini üretebilir ve eğer iki farklı allel taşırsa o zaman 1:1 oranında iki formu üretilmektedir [25]. A2 β -kazein orijinal β -kazein olarak tanımlanır, çünkü A2 β -

kazein birkaç bin yıl önce Avrupa sürülerinde A1 β -kazein' in görünmesine sebep olan mutasyondan önce bulunmaktadır [25].

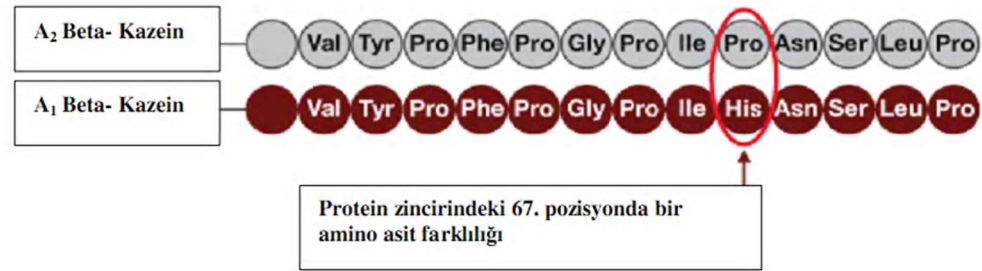


Şekil 1.4. A2 tip β -kazein'den inek sütündeki β -kazein'lerin oluşumu [25].

Beta-kazeindeki genetik polimorfizminin ilk kanıtı Aschaffenburg'un 1961'de yaptığı Jersey ve Guernsey ineklerinden alınan süt örneklerine dayanan çalışmadan gelmektedir [29]. Batı ülkelerindeki ineklerin çoğunluğu genetik varyantı β -kazein A1'i zengin süt üretmektedir. Örneğin, Holstein ve Ayshire ineklerinin yavruları sırasıyla %63 ve %67 A1, %35 ve %33 A2 üretmektedir [6]. A2 β -kazein ise Batı, Afrika, Hindistan ineği ve su bufalosu dahil, bütün büyükbaş hayvan tiplerinde bulunmaktadır [29]. Guernsey yavruları %1 A1 ve %98 A2 üretir [6]. Jersey ırkı tipik olarak Holstein'den bir dereceye kadar daha yüksek A2 allel frekansına sahip olmaktadır. Bazı Jersey inekleri de BKM-7'nin daha yüksek salınma gösterdiği β -kazein allelini taşımaktadır [11].

A1 ve A2 β -kazein proteinleri arasındaki büyük fark 209 aminoasit dizisinin 67. pozisyonundaki tek bir aminoasittir. A2 β -kazein 67. pozisyonda prolin aminoasidine sahipken, aynı pozisyonda A1 β -kazein histidin aminoasidine sahip olmaktadır (Şekil. 1.6) [23]. Altıncı kromozomdaki β -kazein geninin ekzon VII'deki nokta mutasyonunun sonucu olarak, sitozinden adenine dönüşme 67. pozisyonda prolinin (kodon; CCT) histidin (kodon; CAT) ile yer değiştirmesine yol açar [25]. İnek sütündeki A1 β -kazein 67. pozisyonundaki histidin'den dolayı diğer memelilerin β -kazein'lerinden farklıdır. Bu nokta mutasyonu insanlarda, maymunlarda, keçilerde ve koyunlarda yoktur bu yüzden onların sütü sadece A2-benzeri β -kazeine sahiptir ve 'A2 tip süt' olarak isimlendirilir [30]. A1 β -kazein proteini Tip 1 diyabet, iskemik kalp rahatsızlığı ve aynı zamanda

otizim gibi bazı nörolojik durumlara sebep olmaktadır. A2 β -kazein bu durumların oluşumuna sebep olmamaktadır [28, 30].



Şekil 1.5. A1 ve A2 β -kazein proteinlerinde 67. pozisyondaki aminoasit farklılığını gösteren protein zinciri [30].

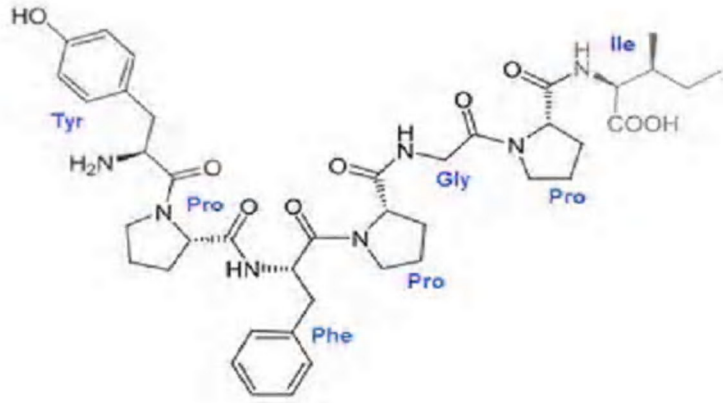
1.1.2.2.2. β -Kazeinlerden β -Kazomorfin Salınımı

β -kazomorfinler, β -kazeinlerden türeyen 3'ten 7 aminoasite kadar değişen küçük peptitlerdir [10]. BKM'ler sindirim esnasında ya da besin işleme esnasında β -kazeinden serbest bırakılmış olurlar. β -kazomorfin-7, Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶ aminoasit sekansından oluşan β -kazein'in opiat-benzeri aktivite gösteren fragmentlerindendir. 60 ile 66 rezidüde yer alan Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile sekanslı peptit ilk kez 1970'lerin sonunda kazein-türevli opioid peptit olarak tanımlanan büyükbaş BKM-7 olarak gösterilmiştir (Şekil 1.6) [11, 14].

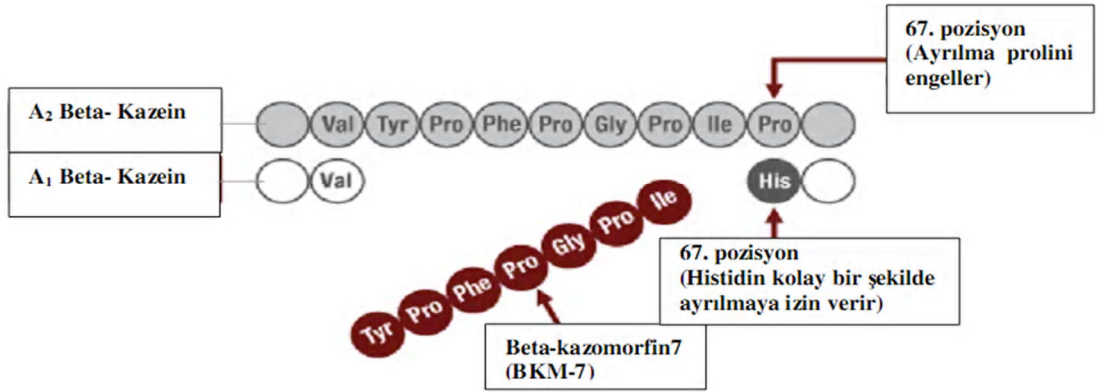
A1 β -kazein 67. pozisyonda histidin aminoasitine sahipken, A2 β -kazein aynı pozisyonda proline sahip olmaktadır. Bu aminoasit değişikliğinden dolayı A1 β -kazein normal enzimatik sindirim sonrası BKM-7'yi serbest bırakırken, A2 β -kazein serbest bırakmaz (Şekil 1.7) [11,14]. 2-3 gr A1 β -kazein içeren bir fincan süttten BKM-7'nin azami kuramsal salınması 66 ile 100 mg arasında olur [12, 30].

Büyükbaş ve insan BKM-7'si peptitin 4. ve 5. pozisyonundaki iki aminoasitten dolayı farklıdır. Büyükbaş orijinli BKM-7 H-Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶-OH sekansına sahipken, insan türevli BKM-7 H-Tyr⁵¹-Pro⁵²-Phe⁵³-Val⁵⁴-Glu⁵⁵-Pro⁵⁶-Ile⁵⁷-OH sekansına sahiptir. Bu yapısal farklılık insan β -kazomorfinlerinden 10 kat daha

güçlü (örneğin; μ -opioid reseptörlerine daha büyük bağlanma affinitesi) olduğunu gösteren büyükbaş süt β -kazomorfınlerinin BKM-7 aktivitesini etkilemektedir [11].



Şekil 1.6. β -kazomorfın-7'nin kimyasal yapısı [31].



Şekil 1.7. β -kazomorfın-7'nin serbest bırakılması [30].

1.2. Peynirde Biyoaktif Peptitler

1.2.1. Biyoaktif Peptitler

Süt proteinleri genellikle temel aminoasitleri sağlayan moleküller olarak bilinmektedirler. Fakat süt proteinlerinden türeyen oligopeptitlerin biyolojik fonksiyonlara sahip oldukları gösterilmektedir. Fermentasyon sırasında kazeinin

parçalanmasıyla açığa çıkan çeşitli uzunlukta oligopeptitler diğer enzimler ile parçalandığında biyoaktif peptitlerin veya bunların ön bileşiklerin oluşumu gerçekleşmiştir [12]. Büyük miktardaki biyoaktif peptitler major kazein ve serum protein bileşenlerinin her 1 gr'ının proteolizi esnasında potansiyel olarak üretilenmektedir [31].

Biyoaktif peptitler doğal protein yapısında aminoasit zincirleri içerisine kodlanmaktadır. Her molekülünde genellikle 3 ile 20 aminoasit kalıntısı bulunduran kısa peptitlerdir. Fakat 64 aminoasit içeren kazeino makropeptit (CMP) bunların istisnasıdır. Küçük boyutlu ve hidrofobik özellikte olmaları daha kolay absorbe edilmelerine yardımcı olmaktadır [13].

Biyoaktif maddelerin bazıları proteinler sayesinde tamamıyla aktifken, diğerleri proteolitik olarak serbest bırakılınca kadar gizlilik arz eder. Gizli biyoaktivitelerin görünmesi proteoliz bölgesine (meme bezi ya da gastrointestinal bölge) bağlı olmaktadır [31]. İnaktif durumdaki biyoaktif maddeler in vivo ve in vitro şartlardaki enzimatik sindirim ve parçalanma sırasında açığa çıkarak aktif duruma geçmektedirler [12]. Buna ilave olarak, biyoaktivitenin tam ekspresyonu sütteki peptit olmayan ajanlarla (lipitler, glikolipitler ve oligosakkaritler) biyoaktif peptitlerin sinerjik etkisini gerektirmiş olur [31].

1.2.2. Peynirde Biyoaktif Peptit Oluşumu

Sütün işlenmesi sırasında, peynir yapımı için kullanılan starter kültürlerin ve proteolitik mikroorganizmaların biyolojik aktivitelerinin yan ürünü olarak biyoaktif peptitler serbest kalırlar [12].

Biyoaktif peptitler süt proteinlerinden 3 farklı yolla üretilmektedir [12]:

1. Sindirim enzimleri yardımıyla enzimatik hidroliz,
2. Proteolitik starter kültürler ile sütün fermentasyonu,
3. Proteolitik mikroorganizma kaynaklı enzimlerin etkisi ile.

Bütün β -kazomorfınlerde bulunan N-terminal Tyr kalıntısı onların biyoaktivitesi için kritik süreç arz eder. Prolin kalıntılarının yüksek içeriğinden dolayı bu peptitler bariz bir

şekilde proteolitik saldırıya direnç oluşturmaktadır. β -kazeinlerin sindirimi esnasında bu biyoaktif peptitler bütün olarak absorbe edilmektedir [32].

1.2.2.1. Peynirde β -Kazomorfin-7

A1 tip inek sütü, opioid olan ve kazomorfin denilen peptitler için potansiyel bir kaynak oluşturmaktadır [33]. Opioid terimi, içinde bir morfin benzeri aktiviteye sahip kimyasal maddeleri ifade etmektedir. Bunlardan bazılarının stres, ağrı ve yanıtta, gıda alınımı kontrolünde önemli rol oynadığı bilinmektedir.

A1 tip süt kullanılarak yapılan peynirlerde, peynir proteolitik mikroorganizmalarının A1 tip beta-kazeini katabolize etmeleri sonucu β -kazomorfin-7 opioid peptidi meydana gelmiş olur. BKM-7 opioid peptiti (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) besin proteinlerinden türeyen biyoaktif peptitin ilk örneği olmaktadır. Özellikle, beyin sapında ifade edilen μ -opioid reseptör ligantıdır. Biyoaktif peptit olan BKM-7' nin N-terminalindeki "Tyr-Pro-Phe" opioid özelliklere sahip olduğundan dolayı vücutta morfin benzeri aktivite gösterebilmektedir [11, 14].

Güçlü bir opioid aktivite sergileyen bir peptid olan BKM-7, opioid özelliğini N-ucundan sıralanan "Tyr-Pro-Phe" dizisinden alır. Bu dizi bir morfin benzeri eylem yapabilmektedir [14]. Öte yandan, son dört aminoasit "Pro-Gly-Pro-Ile" kalıntısı pankreatik beta hücreleri spesifik glukoz taşıyıcısı olan GLUT-2 molekülü ile homologisi ileri sürülmüş olur. Bunlar ana protein dizisi içinde aktif değildir ve gastrointestinal sindirim (sindirim enzimler tarafından hidroliz) veya gıda işleme (teknolojik işlem sırasında ya da proteolitik olgunlaşma) esnasında salınır veya vücut kendisi tarafından üretilmiş olur [30, 33, 35]. Muhtemelen taklitcilikte rol alan bu moleküllerin, Yeni Zelanda Samoan çocuklarında Tip-I diyabet insidansı artışı gözlenmesinin sebebi olduğu anlaşılmıştır [30].

Beta-kazomorfin tüketiminin birçok hastalığa sebebiyet verdiği ve risk faktörü olduğu çok çeşitli çalışmalarda yıllar boyunca ifade edilmektedir [30]. Bu amaçla, sütte ve süt ürünlerinde opioid aktif peptidlerin varlığı ve miktar analizleri, süt kalitesi parametreleri ölçümleri arasına katılmaktadır [34].

Bugüne kadar yapılan çalışmalardan yola çıkarak, tip 1 diyabet gelişiminde rolü olan BKM-7'nin, Swinburn (2004) ve Truswell' in (2006) sağlık sorunları raporları sonucuna

dayanarak besinlerde bulunmasına izin verilmemiştir (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi Bilimsel Raporu, 2009).

Dünya üzerinde öneme sahip olan A1 ve A2 tip süt ayrımı için çeşitli çalışmalar yıllardır süregelmiştir. Bunun için öncelikle hayvanların genotiplemesi ve süt ve süt ürünleri kazeinlerinin protein özellikleri çalışılmaktadır. Kurek ve ark (1992), β -kazomorfın-7 ve histamin enjekte edilen kobaylarda benzer alerjik reaksiyonlar (dermatik pasif anafilaksi testi) verdiğini bildirmiştir [36].

1990'ların sonunda, bazı raporlar kazein varyantı A1 tüketimini bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur [27]. İnsanlarda diyabet (insüline bağımlı) ve iskemik kalp hastalığı kazein varyantı A1 tüketimi sonucu arttığı gösterilmiştir [27, 28]. Ayrıca, ani bebek ölümü sendromu (SIDS) beta-kazomorfın ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [10]. İnsan sağlığı üzerindeki süt proteinlerinin diğer potansiyel etkisi süt alerjisidir.

1.2.3. Biyoaktif Peptitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

1.2.3.1. β -Kazomorfınların Diyabet Hastalığı ile İlişkisi

Diyabet hastalarına ve sağlıklı kişilerde lipopolisakkarid (LPS) stimülasyonu sonrası periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) sitokin üretimi bağışıklıkta hücresel yanıtları çözmek için kullanılmaktadır [37, 38, 39]. Bu amaçla, BKM-7 tahribatı üzerine PBMC tarafından yayımlanan sitokin düzeylerindeki değişiklikler ELİZA testinin kullanımı ile sitokin yapılmıştır [37]. Benzer bir sistem diyabetiklerde bağışıklık sistemi üzerinde BCM-7'nin etkisini araştırmak için kullanılmıştır. Doğan ve ark.'nın (2006) çalışmasında, kan serum konsantrasyonları Tip 1 diyabetli çocuklarda ELİZA yöntemi ile TNF α , IL-2 ve IL-6, IL IL-2 ve IL-6 düzeyleri araştırılmış ve diyabetin tüm aşamalarında tespit edildiği gösterilmiştir [40]. Son iki çalışma çalışmada sağlıklı ve diyabetik bireylerin PBMC kültürlerde BKM-7 etkilerini değerlendirmek için ön deney tasarımı önermişlerdir.

Biyoaktif peptitlerin immünomodülatör etkileri hücre kültürü ve in vivo şartlarda çalışılmıştır [31, 41, 42]. Çoğunlukla sitomodülatör etkileri üzerinden B-lenfosit salgılama artışına ve immünomodülatör artışa sebep oldukları belirtilmektedir. Peptitlerin zararlı etkileri uzun yıllardan bu yana çok farklı çalışmayla gösterilmiş olmakla beraber, son zamanlarda peptitlerin bazı yararlı etkilerini gösteren çalışmalarda sunulmuştur.

Özellikle Tip I diyabet üzerine engelleyici etkileri [27], potansiyel antikarsinojenik ve oksidatif stres üzerine azaltıcı etkileri üzerine araştırmalar da yayımlanmaktadır [43, 44]. Bunlarla beraber peptitlerin hastalık etmeni ve risk faktörü olmalarına yönelik çalışmalar ağır basmıştır. Bu sebepten, inek sütüne alternatif sütlerin, koyun sütü kısrak sütü ve özellikle keçi sütü için biyoaktif peptitler ve besin değerlerine yönelik çalışmalar yapılmakta ve inek sütü yerine önerilmiştir [45, 46, 47, 48].

1.2.3.2. Sindirim Sistemi Üzerine Etkileri

Beta-kazomorfınlerdeki prolin kalıntılarının yüksek içeriği birçok degradatif enzimlere-pepsin, tripsin ve kimotripsin- direnç arz etmektedir. Beta-kazomorfın-7 peptiti proteolizlere β -kazomorfın-5 ya da β -kazomorfın-3'ten daha dirençlidir. Buna rağmen β -kazomorfınler sindirim sonucu açığa çıkmış olurlar. β -kazeinler bağırsakta, dipeptidil dipeptidaz-4'ün (DP4) etkisiyle intestinal zarın mukozal bölgesinde β -kazomorfınlere ayrılarak emilmektedirler. Daha büyük peptitlerden X-Pro (N-terminal) dipeptitlerini kesmek DP-4'ün görevidir. β -kazomorfınler, Tyr-Pro grubunun enzimatik sindirimi ile serbest bırakılır. Bu yüzden β -kazomorfın peptitleri opioid reseptörlere varmadan ve muhtemelen intestinal zardan geçerken zarara sebep olurlar [11].

Süt ve süt ürünlerinin her formu yutulduktan sonra, kazeinin gastral enzimatik yıkılmasıyla bebeklerin midesinde β -kazomorfınler gibi daha küçük peptitlere şekillenir. Beta-kazomorfınler bir kez şekillendiğinde, proteolizlere oldukça dirençli olduklarından, midede önemli seviyelere ulaşmış olurlar [3].

1.2.3.3. β -Kazomorfınler ve Ani Bebek Ölüm Sendromu (SIDS) İlişkisi

Çocukların ana besin kaynağı olan süt, Ani Bebek Ölüm Sendromu'nu güçlendiren, bütün çocuklarda yaygın olan bir faktördür. Bebeklerin olgunlaşmamış merkezi sinir sisteminden dolayı absorpsiyonu takip eden gastrointestinal yolda, β -kazomorfınler kolayca kan-beyin bariyerini geçebilirler. Bebeklerin vagal sinir gelişiminde ve solunum kontrolündeki anormallikler, süttten elde edilen opioid peptitlerin beyin sapındaki solunum merkezlerinde çöküntüye sebep olması nedeniyle meydana gelmektedirler. Buna bağlı olarak da bebeklerde ve çocuklarda, opioid aktif peptitlerin Apne ve SIDS'na sebep oldukları görülmüş olmaktadır [5].

Wasilewska (2011) SIDS potansiyeli ve apnesi olan bebeklere ait kan serumları örneklerinin DPPIV etkinliği için β -kazomorfın miktarlarını anlamlı bulmuşlardır [6].

1.2.3.4. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Yıllardır süt yağı da dâhil olmak üzere hayvansal yağ içeriği yüksek olan gıdaların, koroner kalp hastalıkları (KKH) açısından yüksek risk taşıdıkları öne sürülmektedir. Satüre yağ asitlerinin (SYA) yüksek oranda aterojenik (damar içi duvarında daralma yapan) olduğu görüşü, çevreyle ilgili çalışmalardan köken almıştır. Süt ürünleri kaynaklı yağ tüketimiyle KKH mortalitesi arasında bir bağlantı olduğu da öne sürülmektedir. Ayrıca klasik çalışmalar diyet ve yaşam tarzı ile ilişkili faktörlerde yapılan değişikliklerin mortaliteyi düşürdüğünü göstermiş olur. Örneğin, Kuzey Karelia Projesindeki düşük mortalite, büyük oranda süt ürünleri kaynaklı SYA ve kolesterol alımının azaltılmasına, yaşam tarzı ile ilişkili faktörlerde yapılan değişikliklerle birlikte, çoklu doymamış yağ asitleriyle meyve ve sebze alımındaki azalmaya bağlanmıştır. Ancak populasyon içi kohort çalışmalarının bulguları arasında tutarsızlıklar bulunmaktadır [13].

Bazı çalışmalarda, süt ürünleri alımı ile KKH mortalitesi arasındaki bağlantı bulunamamıştır. Bazı olgularda, süt ürünleri alımı ve KKH risk belirteçleri, insülin duyarlılığı ve yüksek kan basıncı arasında şaşırtıcı olarak ters yönde bir ilişki gözlenmektedir. Süt ürünleri alımı ile KKH mortalite ve morbiditesinde artışa işaret eden çalışmalarda ise, peynir ve bazen mayalanmış süt ürünlerinin istisna oluşturduğu, kolesterol ve SYA'nın alımının fazla olduğu bir alt grupta, süt ürünleri alımı ve KKH mortalite veya morbiditesi arasında bağlantı olmadığı görülmektedir. Diğer araştırmacılar, süt ürünleri kaynaklı yağ alımı ve KKH mortalitesi arasında anlamlı bir bağlantının, peynir dışındaki süt ürünlerinde görüldüğünü sunmuşlardır [47].

Elwood ve arkadaşları, süt ve KKH ile ilgili önemli bir deneme yayınlamışlardır. Süt içimi ile vasküler hastalık arasındaki 10 prospektif çalışmadan yola çıkarak, süt tüketimi en yüksek ve en düşük olanlarda iskemik kalp hastalığı riskini bulmuşlardır. İskemik kalp hastalığından ölüm ve β -kazein Al'in tüketimi arasındaki güçlü ilişki birkaç popülasyonda karşılaştırılmıştır. Sonuçlara ilişkin verilerin az olduğu bir çalışma dışında hiçbir çalışmada, süt tüketimi en fazla olanlarda riskin arttığına dair bir kanıt açığa çıkmamıştır [49].

1.2.3.5. Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Kazomorfin ve gluteomorfin multisistem nörolojik hastalıkların bazı alt türleri için, şizofreni ve otizm, dikkat eksikliği bozukluğu ADD/ADHD, epilepsi ve yaygın gelişim bozukluklarına da sebep arz etmektedirler. Otizm, kazomorfin ve gluteomorfinin bir kişi üzerinde sahip olabileceği etki türlerine bir örnektir [50].

Otizm kişilerin bedensel işleyişini ve yaşam keyfini bozan ciddi bir hastalıktır. Otistik çocuklarda hiperpeptitüri bulunmuştur [51]. Sıradan çocuklarda nöbetler ve epileptik atakların sıklığı yaşla birlikte azalmaktadır. Otistik çocuklarda epilepsi ve EEG anormalliklerinde yaşla artan bir artış göstermektedir. Epilepsi hastalığındaki frekans artışına paralel olarak çölyak hastalığı da artmaktadır. Ayrıca çölyak hastalığında idrardaki artan opioidler de tespit edilmiştir [66]. Bu durumda, kazomorfin ve gluteomorfin peptitlerinin idrar içinde tesbiti, çocuklarda önemli hale gelmiştir. Çocuklarda, Otizm tanısı koyabilmek için idrar örneklerinde Gluten/Kazein peptitlerinin ELİZA ile tayini yapılmaktadır [50].

Gluten/Kazein ELİZA testi aynı zamanda AD(H)D, şizofreni, MS, beslenme bozuklukları, down sendromu, sindirim bozuklukları gözlenen çocuklarda tanı için başvurulmuş bir yöntem olmaktadır. Test sonucunda hassas bir standart eğri yakalanarak uygun gluten ve kazein diyeti uygulanmaktadır. Sıkı bir glutensiz ve kazein diyet hasta için yararlı etkileri olduğunu aşikâr olmuştur [53]. Diyetteki başarısızlık ciddi sorunlar getirebilmektedir. Çünkü bu gıdalar otistik çocukların beyinleri için toksik nitelik göstermektedir. Diyet tüm süt ürünlerini çıkarma anlamına gelmektedir [50].

Otistik çocuklarında idrarlarında SPE-HPLC-tandem mass spektrometri ile β -kazomorfin gibi ekzojen peptit miktarları ölçülmüş ve kontrollere göre otistik çocuklarda peptit miktarları yüksek bulunmuştur [51].

Süt, tereyağı, peynir, krem peynir, ekşi krema, vb aynı zamanda soya peyniri, ton balığı ve hatta ekmek kazein içermektedir. Bu sebeple süt ürünlerindeki β -kazomorfin tayini önem teşkil etmektedir [54]. Yapılan bir çalışmada yeni doğmuş bebekler için üretilen ticari bir bebek maması agonistik dört opioid peptide karşı test edilmiş ve β -kazomorfinlerin olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada izole tavşan bağırsağı motor aktivite üzerindeki etkileri incelenerek HPLC’de belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu formüllerin opioid aktivite çeşitliliği ek bir göstergesi olabileceği öne sürülmüştür [68].

Otistik hastaların kan serum ve BOS'larında opioid peptitlerde artış bulunmaktadır. Bunlardan bazılarının da sığır kazomorfin peptiti olduğu tespit edilmiştir. Otistik hastaların idrarında tespit edilen gliadinomorfin, gluteomorfin, deltorfin, dermorphin ve kazomorfinlerin oluşturduğu kronik etki, hastalık semptomu olan sosyal kayıtsızlık davranışını açıklayabilmiştir [55].

Tveiten ve Reichelt (2012), şizofren hastaların idrarında artmış opioid peptit düzeyleri bulunmuşlardır. HPLC üzerinde değişik eğimlerin kullanımı ile eksorfinlerin peptit kromatografileri rapor edilmiştir. Şizofrenide genetik ve diyetel faktörlerin şizofreni ile ilgisi gösterilmektedir [56]. İsveçli bir grup, reseptör bağlayıcı opioidlerin düzeyine ilişkin şizofreninin belirtileri nitelendirmiştir ve postpartum psikoz sırasında insanlarda kazomorfin artışı göstermişlerdir [10].

Bunların yanında, β -kazomorfinlerin depresyonla ilişkisi, depresyon teşhisi konulmuş hastaların idrarlarında artmış β -kazomorfin peptitlerinin tespitiyle sunulmuştur [57].

1.3. Biyoaktif Peptitlerin Tayini

1.3.1. Biyoaktif Peptitlerin İmmünolojik Yöntemler ile Tayini

Antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tekniklere genel olarak enzim immunotest (enzyme immunoassay, EIA) denilmektedir. Radyoimmüno-testler (RIA) EIA'den daha önce kullanılmaya başlanmış, ancak işaretleme için I^{125} gibi kısa ömürlü izotopların kullanılması, toplum sağlığı ve çevreye zararlı radyoaktif madde kullanımı, RIA'nın endokrinoloji laboratuvarlarında kullanımı ile sınırlı kalmasına neden olmuştur [58].

ELİZA sistemleri 1960'larda radioimmunoassay yöntemlerine alternatif aranırken bulunmuştur. EIA'de kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması ve otomatize edilebilmesi diğer iki tekniğe olan üstünlüğüdür. Daha önemlisi laboratuarlara çok fazla sayıda örnekle çalışma olanağı verdiği gibi analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır [58].

1.3.1.1. Enzim-Bağımlı İmmüno Ölçümler (ELİZA)

EIA diye isimlendirilen yöntemler, homojen ve heterojen olmak üzere iki çeşittir. Homojen tekniklerde, enzim bir hapten ile konjuge hal oluşturur. Tekniğin esası, bu konjugatın antikor ile reaksiyona girmesi halinde enzim aktivitesinin başlamasına dayanmaktadır. Ancak bu tekniğin düşük moleküler ağırlıklı maddeler kullanma zorunluluğunun bulunması, pahalı ve zahmetli olması gibi dezavantajlarıdır. Bu nedenlerden dolayı sıklıkla kullanılmazlar [60].

Heterojen EIA'da bağlı olan ve olmayan reaktifler birbirinden yıkama işlemi ile fiziksel olarak ayrılmaktadırlar. ELİZA heterojen EIA'ya örnektir. ELİZA'da bir enzimle konjuge edilmiş antikor (veya antijen), substratı ile reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturmaktadırlar. ELİZA testleri antijeni veya antikoru (sınıfa özgül antikor da olabilir) ölçmek için kullanılmaktadırlar [60].

ELİZA karmaşık bir teknik olmamasına rağmen, bu teknikte birçok değişken kontrol edilmektedir. Katı faz, yıkama işlemleri, kullanılan enzim ve substratların seçimi ve etkinliği, reaksiyonların sonlandırılma zamanı, kontrol edilmesi gereken değişkenlerdir. Katı faz olarak çoğunlukla mikrotitrasyon plakları şeklinde plastik kullanılmaktadır. Polistren mikrotitrasyon kuyucuklarından başka, plastik boncuklar, ferröz boncuklar ve nitrosellüloz membran da solid materyal olarak kullanılabilir [60].

ELİZA'da kullanılan enzimler kinetikleri ve konjuge edilme dereceleri açısından iyi tanımlanmış enzimlerdir. Bunlar peroksidaz, alkalen fosfataz, β -galaktozidaz gibi substratları renkli ürünlere çevirebilme yeteneğinde olan enzimlerdir. Bu renkli ürünler standart spektrofotometrede okutulabilir. β -galaktozidaz kullanılmışsa florimetrede okunmalıdır. Substratlar genellikle alkalen fosfataz için nitrofenil fosfat, peroksidaz için ortofenilendiamindir [60].

1.3.1.1.1. ELİZA Metodunun Çeşitleri ve Prensipleri

Genel olarak 6 farklı ELİZA protokolünde bulunmaktadır [59]. En çok bilinenleri yarışmalı (kompetatif) ve direkt ELİZA testleridir. Yarışmalı ELİZA genellikle küçük molekül ağırlıklı antijen varlığını göstermek için kullanılmaktadır. Aranılan antijene özgül antikor katı faza bağlanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve test edilecek antijen (klinik örnek) katı fazdaki antikora aynı zamanda eklenir ve her iki antijenin de

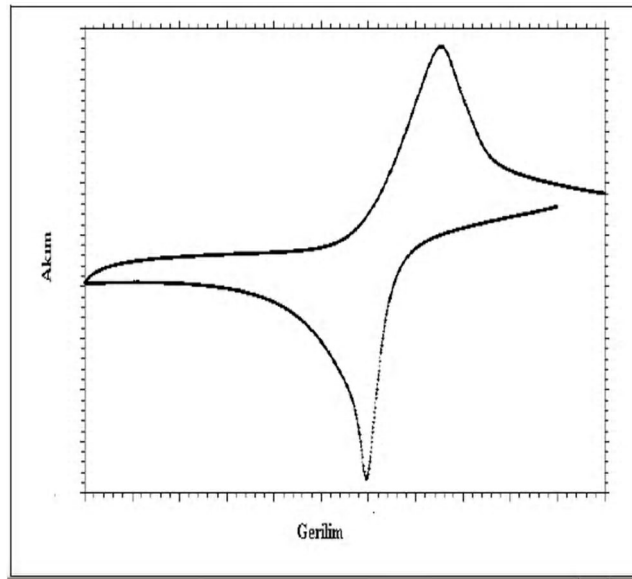
antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması amacıyla inkübe edilmektedir. İnkübasyondan sonra yıkanarak bağlanmamış antijenler uzaklaştırılır ve enzim substratı konarak inkübe edilmektedir. Bağlanmış enzim substratla reaksiyona girerek renk oluşturur, spektrofotometrede absorbands okunur. Substratın ürüne dönüşüm miktarı, örnekteki antijen miktarı ile ters orantılıdır. Sonuçta renk değişikliğinde azalma olursa bu klinik örnekte antijen varlığını göstermektedir [61]. ELİZA plakları hazırlanırken, antijen aranacaksa antijene özgül antikor veya antikor aranacaksa antikora özgül antijen katı faza bağlanmalıdır. Plakların kaplanma işlemi, 2 saat 37°C'de ya da bir gece oda ısısında veya bir gece +4°C'de bekletildikten sonra yıkama yapılarak gerçekleştirilir. İnkübasyonlar ise 1-2 saat 37°C'de yapılmaktadır [61]. Antijen saptama için kullanılan yakalama testinde katı faza poliklonal veya monoklonal antikor bağlanmaktadır. Enzimle işaretli antikor da poli veya monoklonal olabilir [61].

1.4. ELEKTROKİMYA

Maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesi sonucu ortaya çıkan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalına elektrokimya denmektedir. Elektrokimyasal tepkimeler, yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir. Elektrokimyasal işlemler, elektrokimyasal hücre adını alan bir düzende yürütülmektedir. Elektrokimyasal hücre, incelenen maddeyi içeren bir çözelti ya da erimiş tuz, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrotlar ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir dış devreden oluşmaktadır. Hücrede bulunan iyon veya molekül halindeki madde katot adı verilen elektrotta elektron alarak indirgenmektedir. Bu indirgenme ile birlikte yürüyen bir yükseltgenme tepkimesi vardır. Anot adı verilen ikinci bir elektrotta ortaya çıkan yükseltgenme tepkimesi sırasında iyon veya molekül halindeki madde ya da elektrot malzemesinin kendisi elektron verir. Böylece elektrotlarda tepkimeye giren her bir tür, dış devrede belli sayıda elektronun iletilmesine neden olmaktadır. Elektrik akımı elektrik yükünün akışı nedeniyle meydana gelmektedir. Elektrotları birbirine bağlayan devredeki metalik kısımlarda elektrik yükü elektronlar tarafından taşınmaktadır. Çözeltide ya da erimiş tuz içinde elektrik yükünün taşınması bu ortamlarda bulunan iyonlar tarafından gerçekleştirilmektedir [62].

1.4.1. Dönüşümlü Voltametri

Bu yöntem, karşılaştırma elektrotuna göre çalışma elektrotunun geriliminin belirli bir gerilim programına uyacak şekilde değiştirilmesiyle uygulanmaktadır. Gerilim programı bir başlangıç gerilimi (E1) değerinden başlamaktadır. Zamanla doğrusal olarak değişen ileri yöndeki gerilim değerine (E2) ulaşıldıktan sonra tarama yönü ters çevrilmektedir. Yeniden E1 başlangıç değerine ulaşıldığında gerilim programı tamamlanmaktadır. İleri ve geri yöndeki tarama hızları genellikle aynıdır. Ancak istenildiğinde farklı tarama hızları da uygulanmaktadır. İleri yöndeki gerilim taraması sırasında çalışma ve karşıt elektrotlar arasında geçen akım kaydedilirse pik şeklinde bir akım-gerilim eğrisi elde edilmektedir. Bu pik çözeltideki elektroaktif maddenin yükseltgenmesine (ya da indirgenmesine) karşı olur. Gerilim tarama yönü ters çevrildiğinde yükseltgenmiş elektroaktif türün yeniden indirgenmesine (ya da yükseltgenmesine) karşı gelen bir geri pik gözlenmektedir (Şekil 1.8) Gerilim programı art arda uygulandığında ise birçok döngülü dönüşümlü voltamogram elde edilmektedir.



Şekil 1.8. Dönüşümlü voltamogram

Bu sistemde çalışma elektroduna uygulanan gerilim elektroaktif maddenin yükseltgenme gerilimine ulaşınca yükseltgenme olayı başlamaktadır. Elektrot yüzeyini çevreleyen kısımdaki madde tüketilmektedir. Bu nedenle akımda hızlı bir artış gözlenir. Bu sırada çalışma elektrodu civarında bir difüzyon tabakası oluşur ve çözeltiden elektrot yüzeyine doğru difüzyonla madde aktarımı başlamaktadır. Difüzyonla kütle aktarım

hızı, elektron aktarım hızından çok daha küçük olduğunda voltamogramın tepe noktasından sonra akımda üstel bir düşüş gözlenmiş olur. Dönüşümlü voltamogramların ayrıntılı olarak incelenmesi ile bir sistemin hangi gerilimlerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgenebileceğini, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, elektrot tepkimesinin bir çözelti tepkimesi ile el ele gidip gitmediğini, indirgenme veya yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığını, elektrot tepkimesinde yer alan türlerin yüzeye tutunup tutunmadıklarını anlamak mümkün olur. Elde edilen dönüşümlü voltamogramlar elektron ve kütle aktarım hızlarına, elektrot yüzeyinde ve çözeltide oluşan bağlaşık kimyasal tepkimelere bağlı olarak değişik şekiller almaktadırlar.

Dönüşümlü voltametrinin yararlı bir yönü de değişik tarama hızlarında uygulanabilmesiyle olur. Böylece elektrot tepkimesiyle oluşan ara ürünlerin kararlılıklarıyla ilgi görüşler belirlenmektedir [63].

1.5. BİYOSENSÖR

1.5.1. Biyosensörler

Bir biyosensör, Ulusal Araştırma Konseyi (ABD Ulusal Bilimler Akademisi) tarafından [63]:

- a) Canlı bir organizma veya ürün bulunduran (örneğin, bir enzim ya da bir antikör) ve
- b) bir transdüser (transducer, dönüştürücü) ile elde edilen ürünü tayin eden bir gösterge, sinyal veya başka bir şekilde ortamda belirli bir maddenin varlığında tanıma gerçekleştiren algılama aygıtı olarak tanımlanır.

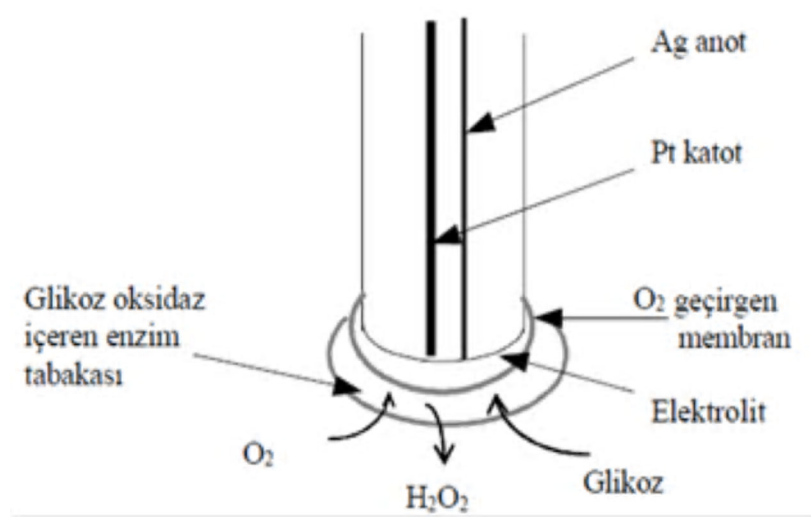
Biyosensörlerde biyokomponentin transdüser üzerine bağlanması ve stabil hale getirilmesi işlemine immobilizasyon denilmektedir. Bir biyosensör geliştirme sürecinde, biyoreseptör ve transdüser yapısındaki etkileşim biyosensör fonksiyonunda çok önemli olduğu için doğru türü tespit etmek önemli olur. Bir platformda bu parçaların immobilizasyonu temelde reseptör-transdüser (dönüştürücü) etkileşimini ve biyosensör genel işlevini belirler. Bu nedenle; bileşenlerin immobilizasyonu biyosensörün kullanışı ve verimliliği açısından önem arz eder. Immobilizasyon sonucunda biyokomponentin aktivitesi ve özgüllüğü kaybedilmemesi gerekir. Farklı biyobileşenler için farklı immobilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bazı immobilizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları Tablo 1.3'de listelenmiştir [64, 65].

Tablo 1.3. Farklı immobilizasyon yöntemleri [65].

Metod	Avantajlar		Dezavantajlar
Adsorpsiyon	Basit, ucuz Tek kullanımlık uygulamalar için iyi		Nispeten istikrarsız. Hidrofobik yüzeylerde proteinler denatüre olur. Adsorpsiyon, yüksek pH, sıcaklık, çözücü, yüzey ve biyomolekül bağımlıdır. Kapsamlı optimizasyon gerekebilir.
Yakalama (Entrapment)	Membranın arkasında Polimer jelde	Makromoleküller için basit evrensel yaklaşım Yakalanan protein fazla miktarda Uzun çalışma ömrü Seri üretim potansiyeli	Difüzyon bariyeri yüzünden tepki süresi yavaşlar. Serbest radikaller tarafından protein denatürasyonu
Kovalent Bağlama	Stabil birleştirme Transdüser ile yakın temas Düşük difüzyon bariyeri-hızlı tepki		Karmaşık ve maliyetli adımlar Kısa ömürlü
İmmobilize polimer yüzeylerde kovalent bağlama	Daha fazla sayıda bağlantı yerleri Artan sinyal ölçüsü		Daha kompleks hazırlama Daha kompleks kinetik ve difüzyon
“Yakalama sistemi” kullanımı	Genel yüzeylerde açık özgüllük Rejenerasyon için birçok seçenek Antikor odaklı çalışma olanakları		Pahalı ve kompleks çoklu adımlı türetme prosedürleri Çok katmanlı yapısı yüzünden sinyal azalabilir. Yakalama sisteminin bileşenlerine özgül olmayan bağlanma

1.5.2. Biyosensörlerin Tarihsel Gelişimi

Biyosensörlerin gelişmesi 1950’li yılların ortalarında L.C. Clark’ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlamaktadır. 1962 yılında Clark ve Lyons’un glukoz oksidaz (GOD) enzimini O₂-elektrodu ile birleştirerek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmış oldular. Böylece yeni bir analitik sistem oluşturmuşlardır. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin (enzim) yüksek özgüllüğü diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur [66].



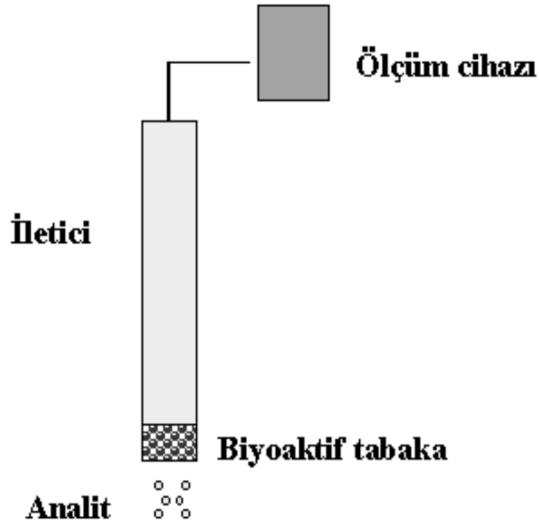
Şekil 1.9. Glikoz tespiti için bir Clark enzim elektrotu [67].

1.5.3. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikleri şunlardır: Seçicilik, uzun kullanım ömrü, minimum kalibrasyon ihtiyacı, tekrarlanabilirlik, kararlılık, duyarlılık, yeterli düzeyde tayin sınırı, geniş ölçüm aralığı, hızlı yanıt zamanı, kolay hazırlanabilme, ucuzluk, küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirliktir (Şekil 1.10).

Kullanılan sinyal çeviricinin türüne göre biyosensörler optik, kalorimetrik, piezoelektrik ve elektrokimyasal biyosensörler olmak üzere dört grupta toplanırlar. Optik biyosensörler biyokimyasal bir tepkime sonrasında absorbe edilen veya yayılan ışığın ölçülmesi ilkesine dayanır. Bu tür bir biyosensörde ışık dalgaları dedektörlere optik fiberlerle ilerler. Kalorimetrik biyosensörler analitin uygun bir biyokomponent ile biyokimyasal tepkimesine bağlı olarak ortaya çıkan ısıya bağlı bir analitin tayinini yapar. Piezoelektrik biyosensörler doğal bir anizotropik kristalin mekanik strese tabi tutulmasıyla oluşan elektrik dipolü prensibine göre çalışmış olur. Analit adsorpsiyonu kristalin kütesini artırır ve kristalin temel salınım frekansını değiştirmiş olur. Bütün bu biyosensörler belirli dezavantajlardan sıkıntı çekerler. Örneğin, optik biyosensörler çok

duyarlı olmasına karşın bulanık ortamlara uygun değildir. Termal biyosensörler ise çok küçük ısı değişikliğinin olduğu sistemlerde kullanılamaz (67).

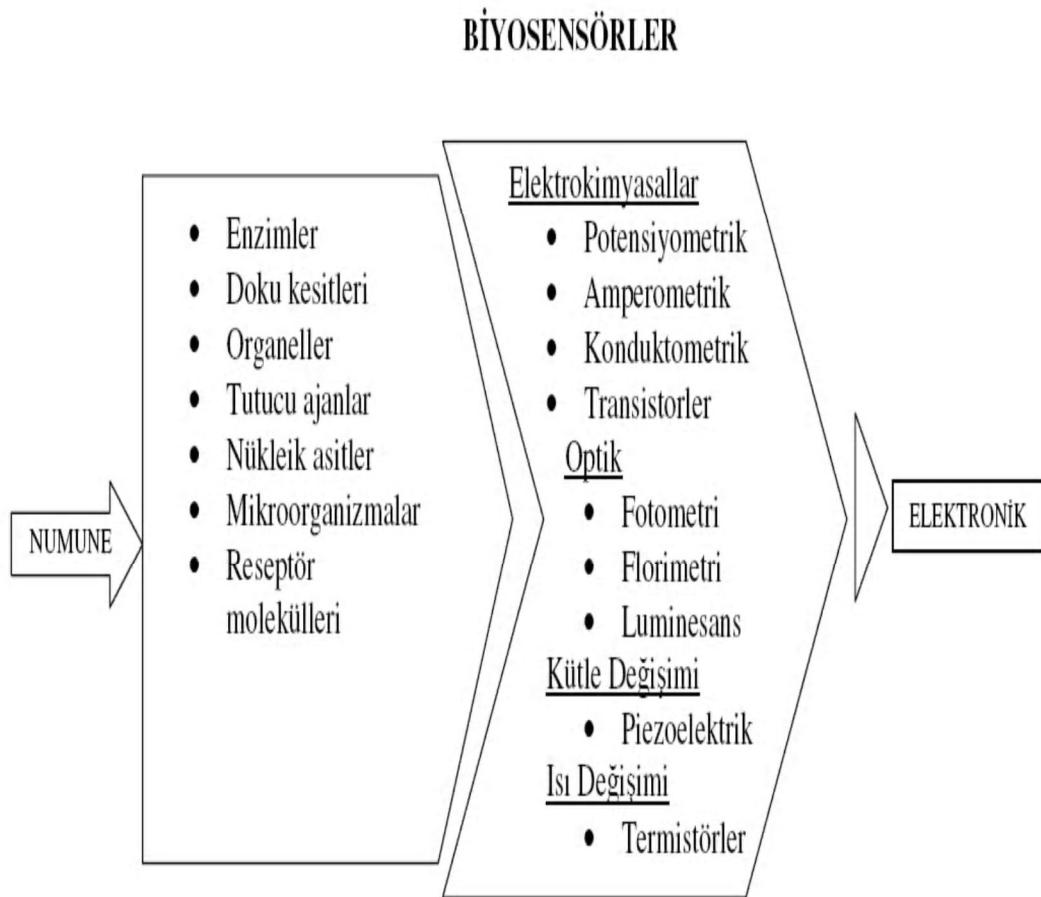


Şekil 1. 10. Bir biyosensörün sematik gösterimi.

Elektrokimyasal biyosensörler günümüzde en çok kullanılan biyosensörlerdir. Bu biyosensörler en basit tanımıyla üzerinde tutuklanmış bir veya birden çok biyolojik katalizör taşıyan elektrotların kullanıldığı sistemlerdir. Elektrokimyasal biyosensörlerde bir biyo-etkileşim sürecinde elektrokimyasal türler bir elektrokimyasal dedektör tarafından ölçülebilen bir elektriksel sinyal oluşturarak, harcanır veya üretilir. Bu biyosensörler, bulanık ortamlarda kullanılabilir, oldukça yüksek duyarlılığa sahip, küçük boyutlarda ve ucuzdurlar. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte elektroaktif özellik gösteren çeşitli kimyasal ve biyolojik maddeler uygun biyosensörler geliştirilerek daha kolay, daha çabuk ve daha duyarlı tayin edilmektedirler. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateriyalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkün kılınmıştır. Bununla birlikte biyomateriyalin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısalttığından bir dezavantaj olmaktadır. Biyosensörlerin yapısında görev alan biyomateriyaller çoğu kez biyoreseptör olarak da adlandırılmaktadır. Bunların içinde en yaygın olarak kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Protein yapılı makromoleküllere ek olarak hücre, doku, nükleik asitler ve DNA da biyoreseptör olarak kullanılmaktadır. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi şekil 1.11’de verilmektedir.

1.5.4.Biyobileşenler (Biyokomponentler, Biyoreseptörler)

Biyosensörde en önemli bileşen; analizi yapılacak analite karşı oldukça hassas fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren biyoreseptördür. Bu reseptörler tek bir substratı bağlayacak ve farklı substratlara bağlanmayacak seçici karakterde olmalıdır. Temel olarak üç grup biyoreseptör vardır, bunlar; biyokatalitik reseptörler, biyoaffinite reseptörleri ve hibrit reseptörlerdir [73].



Şekil 1.11. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi.

a) Biyokatalitik reseptörler: Analiz edilecek maddeyi belirlenmeyen formdan tespit edilebilir ve transdüserle kaydedilebilir forma dönüştürmektedirler. Biyokatalitik tanıma elementleri enzim içeren sistemler, hücreler (mikroorganizmalar; örneğin bakteriler,

ökaryotik hücreler, mayalar), organeller ve bazı doku parçalarından oluşmaktadırlar [67,73].

b) Biyoafinite reseptörleri: Seçilmiş bir ligandı termodinamik yol ile sabit kompleks formuna dönüştüren belirleyici etkileşimler göstermektedirler [71]. Antikorlar, nükleik asitler, lektinler, boyalar, hücre membran reseptörleri ve diğer özgül bağlayıcı ajanlar gibi biyolojik bileşenler biyoafinite reseptörleri çeşitlerindendir. Hormonlar, ilaçlar, virüsler tümör antijenleri, bakteri antijenleri ve diğer birçok protein benzeri analitlerin belirlenmesi ve ölçümü immünolojik metotlar sayesinde minimum konsantrasyonlarda başarılmaktadır [65, 74].

c) Hibrit reseptörleri: Genellikle farklı makro moleküllerin aynı anda biyokomponent olarak biyosensör yüzeyinde kullanılmasıyla oluşmaktadırlar. Hibrit reseptörler olarak biyosensör uygulamalarında nükleik asit kullanımı belirtilmiştir. Sinyal üretimi için protein-DNA, aptamer-oligonükleotidler, DNA-RNA gibi makro moleküller elektrot yüzeyine hibritlenmektedir. Bu sensörlerin kullanım alanları DNA’da meydana gelen zararları kimyasal olarak belirleme ve DNA’nın türe özgü diziliminin hibridizasyonu ile mikroorganizmaların belirlenmesinde uygulanmaktadır [73].

1.5.5. Fiziksel Bileşenler

Biyosensörlerde biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir sinyallere dönüştürebilen sistemlere transdüser denilmektedir [70]. Bir substrat için bileşenin aktivitesi O_2 harcanmasıyla, H_2O_2 üretilmesiyle, biyokimyasal redoks tepkimelerle, floresans, absorpsiyon, yansıma, pH farklılığıyla, kondüktivite, ısı, elektrokimyasal ya da kütledeki değişimle ölçülmektedir [74]. Transdüserler, elektrokimyasal, optik, akustik ve termal transdüserler olarak gruplandırılmaktadır. Elektrokimyasal transdüserler ise, amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik olarak sinyal iletici sistemlere ayrılabilir.

Günümüzde biyosensörler; analite bağlı olarak biyobileşen ve transdüser çeşitlerinin bazıları Tablo 1.4’de verilmiştir.

Tablo 1.4. Biyosensör bileşenlerinin içeriği [70,74].

Analit	Biyobileşen (Biyoreseptör)	Sinyal İletici Sistem (Transdüser)
Metaller	Enzimler	Elektrokimyasal Esaslı
Hormonlar	Antikorlar	Amperometri
Enzim-Koenzimler	Hücre-doku kesitleri	Potansiyometri
Substrat	Mikroorganizmalar	Yarı iletken esaslı
Aktivatör – İnhibitör	Nükleik asitler	Optik esaslı
Antikor- Antijen	Lipitler	Fotometri esaslı
Nükleik asit	Hücre organelleri	Fluorometri esaslı
Mikroorganizmalar	Reseptörler	Biyolüminesans
Virüsler		Piezoelektrik
		Kuartz kristal mikrobals

1.6. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

1.6.1. Biyobileşen (Biyoreseptör) Materyalleri Temel Alınarak Yapılan Sınıflandırma

1.6.1.1. Enzim Bazlı Biyosensörler

Enzimler yüksek özgüllüklerinden dolayı en sık kullanılan biyoreseptörlere örnektir. Enzim biyosensörleri enzim aktivitesinde görülen inhibisyon ya da aktivasyon esasına dayanırlar ve kirleticilerin dolaylı analizini sağlamaktadırlar. Çünkü bu tür sensörler, ölçüm ortamındaki renk, bulanıklık ve partiküllerden etkilenmezler [67].

Kandaki glukoz konsantrasyonu tayininde kullanılan oksijen eletrotlu amperometrik glikoz biyosensörü klasik örneklerinden biridir. Başka bir örnek olarak, sudaki fenolik bileşiklerin saptanmasında kullanılan peroksidaz ve tirozinaz enzim temelli biyosensörlerdendir [76, 77].

1.6.1.2.Hücre Bazlı Biyosensörler

İlk hücre bazlı biyosensör, Diviés (1975), tarafından etanol analizi için *Acetobacter xylinum* hücrelerini kullanarak tasarlanmaktadır [79]. Bir mikrobiyal biyosensör, solunum temelli transdüser ile immobilize edilmiş canlı mikrobiyal hücreler ve hücrelerin metabolik aktivitelerini kapsamaktadır. Bu süreçte izlenmek istenen analit, substrat, inhibitor veya bunların değişimleri olabilmektedir.

1.6.1.3.Antikor Bazlı Biyosensörler (İmmunosensörler)

Antijen-antikor etkileşimini temel alan mükemmel seçicilik özellikleri olan yüksek özgüllükte biyosensör örneklerindendir. Antijen ve antikorlar birbirlerinin tayini için biyolojik bileşen şeklinde kullanılabilir. Hücreler, sporlar, toksinler, mikroorganizmalar, virüsler, pestisitler ve endüstriyel kirleticilerin tayininde kullanılır. İmmunosensörlerde transdüser olarak elektrokimyasal, optik, kütle ve termal yapılar yer alır [80, 82].

Biyoreseptör olarak 1950’li yıllardan itibaren kullanılan antikorlar, yüksek duyarlılıkları ve seçicilikleri kanıtlanmış moleküllerdendir. Antikor temelli biyosensörlerin en önemli özelliği çalışılacak hedefin saptama öncesi saflaştırılmaya gerek olmaksızın doğrudan kullanılma olanağı sağlamasıdır [82].

1.6.1.4.Mikrobiyal Biyosensörler

İlk çalışılan mikrobiyal sensörlerde mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinden ve solunumla ilişkili enzimlerinden yararlanılarak, bu sistemlerin substratları veya inhibitörleri tayin etmekteydi. Geliştirilmiş mikrobiyal sensörler ile genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalarla toksisitenin ve kirletic maddelerin biyolojik olarak tayin edilmesini sağlamaya yönelik uygulamalara önem gösterilmektedir [83].

1.6.1.5.DNA Bazlı Biyosensörler

DNA temelli biyosensörlerinde tanıma komponenti olarak DNA kullanılır. Pestisit tayin çalışmalarında, guanin yükseltgenmesine dayalı DNA biyosensörleri kullanılmaktadır. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, aranan hedefin baz dizisinin karşılığı olan 20–40 baz gibi kısa bir baz dizilimini bulunduran yapay tek zincirli DNA (ssDNA) oligomerin (prob), elektrot yüzeyine bağ kurması ve hedef oligonükleotidle hibridizasyonuna temel alınmaktadır [84].

1.6.1.6.Ribozim Bazlı Biyosensörler

Ribozimler kimyasal tepkimeleri katalizleyen yapay molekül oluşumlarındandır. Ribozimler katalitik tek sarmallı bir RNA molekülleri ve aptazimlerden (aptamer enzimler), DNA ya da RNA ya da katalitik aptamerler (hedef moleküllerine bağlanabilen peptit molekülünden) meydana gelmektedir. Geliştirme aşamasındadır ve henüz herhangi bir ticari kullanımları bulunmaz [83].

1.6.1.7.Doku ve Organel Temelli Biyosensörler

Rechnitz (1993), tarafından arginin tespitinde ilk kez doku esaslı biyosensör temel alınmıştır [81]. İnce bir dilim sığır karaciğeri ve enzim olarak ürazın bir bölümünü çalışmıştır. Hücre membranları, solunum zinciri, kloroplastlar, mitokondri ve mikrosomlar gibi temel hücre fonksiyonlarını sürdüren alt hücresel organeller bazı biyosensörlerde belirli analitleri analiz etmek için kullanılmaktadır. Doku temelli veya organel esaslı biyosensörler, enzim temelli biyosensörlere kıyasla daha yüksek seviyede kararlılık gösterme kabiliyetine sahiptir. Ancak uygulamalarında uzun tespit süresine ihtiyaç duymasına rağmen daha fazla net sonuçlara sahip olmazlar. Enzim inhibitörleri, aktivatörleri ve kararlılığı sağlayan maddeler; seçiciliği geliştirmek, doku ve organel esaslı biyosensörlerin ömrünü uzatmak ve tespit süresini kısaltmak için kullanılır.

1.6.2. Sinyal İletici Sistem (Transdüser) Materyalleri Temel Alınarak Yapılan Sınıflandırma

1.6.2.1 Kimyasal Biyosensörler

Bir kimyasal sensör örnek yapısındaki analit miktarının doğrudan ölçülmesi için kullanılmaktadır. Bu tür bir sensör idealde, örneğe zarar vermeden, sürekli ve tersinir bir şekilde çalışabilmesi gerekir. Kimyasal sensörler hedef analit ile kaplanmış sinyal çevirici bir unsur içermektedirler. Bu etkileşimden meydana gelen kimyasal değişiklikler sinyal çevirici element tarafından elektriksel sinyallere çevrilmektedir. Kimyasal sensörlerin en temel uygulamalarından biri biyosensörlerdir. Elektrokimyasal biyosensör en basit tanımıyla üzerinde tutuklanmış bir veya birden çok biyolojik katalizör taşıyan elektrotların kullanıldığı sistem olurlar. Biyosensörler çeşitli gaz, iyon ve biyolojik maddelerin nitel ve nicel analizinde ve orijinal sistemlerin izlenmesine olanak verdiğinden pek çok bilim dalında uygulama alanı bulmaktadır. Teknolojinin

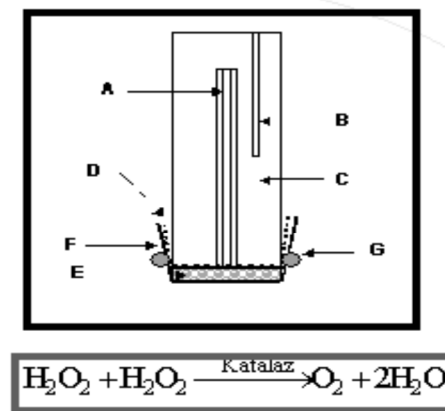
gelişmesiyle birlikte elektroaktif özellik gösteren çeşitli kimyasal ve biyolojik maddeler uygun biyosensörler geliştirilerek daha kolay, daha çabuk ve daha duyarlı tayin edilebilmişlerdir. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayinini mümkün kılar [63].

1.6.2.2. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, ilk kullanılan ve en çok geliştirilen biyosensörlerdir. Erken dönemlerde, özellikle oksijen elektrotunun izlenmesiyle klinik glikoz saptamak için geliştirilen enzim elektrotları şeklindeydiler. Sonra, enzim-bağılantılı imünoelektrokimyasal çalışmalar Heinemann ve arkadaşları (1992), tarafından elektrokimyasal biyosensörlerin hassasiyetini artırmak için tasarlanmıştır ve diğer çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır [85].

1.6.2.3. Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik dönüşüm, elektro aktif türlerin elektrokimyasal olarak yükseltgenmesi ya da indirgenmesine bağlı oluşan, elektroaktif ürünün oluşturduğu akım değişiminin ölçümü üzerine temellenmiştir. Çalışma metotunda bir referans elektroda karşı platin, altın, grafen ya da karbon çalışma elektroduna belirli bir potansiyel uygulanarak yapılır. Elde edilen akım, direk elektro aktif türlerin derişimi ya da biyokatalitik materyal içindeki üretim ya da tüketim hızlarının bir fonksiyonu sonucudur [85].

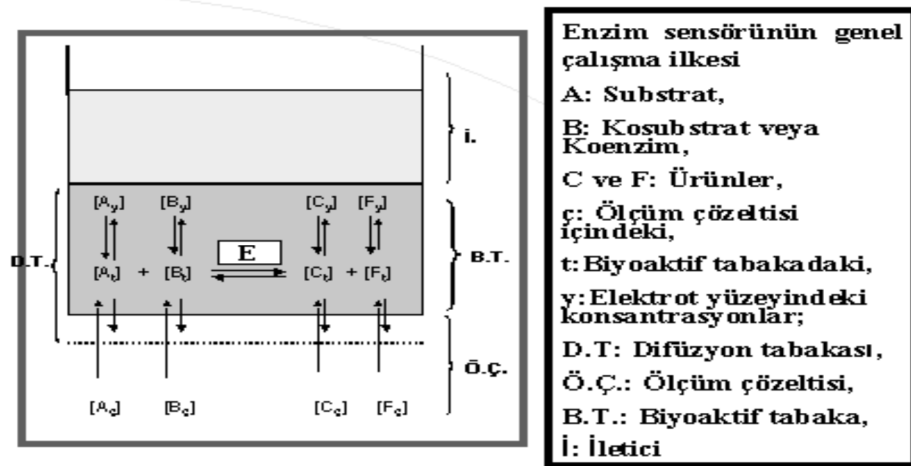


Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi
A: Çalışma elektrodu(Pt),
B: Referans elektrot (Ag/AgCl),
C: Elektrolit çözelti(KCl),
D: İç gaz geçirgen membran(Teflon),
E: İmmobilize enzimi içeren biyoaktif tabaka
F: Dış koruyucu membran(Selüloz asetat v.s)

Şekil 1.12. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi

Diğer yöntemlere göre, yüksek duyarlık, geniş lineer kullanım aralığı, yüksek kararlılık, hızlı yanıt ve ekonomik olması gibi avantajları nedeniyle iyi bir alternatif oluşturmaktadır [86]. Kanda glikoz takibi için geliştirilen ilk biyosensör, bir amperometrik biyosensördür ve oksijen seviyesinde azalma şeklinde saptanmaktadır. Balık tazeliğinin seyri hedefiyle amperometrik biyosensörler geliştirilmiştir [87]. İmmünoyenetik ayırıştırma ile birlikte kullanılan bir biyenzim elektrokimyasal biyosensör gıda numunelerinde *Escherichia coli*, O ve H'nin hızlı tayini için geliştirilmiştir [88]. Asetil kolinesteraz temelli bir biyosensör organik fosfatlı pestisitlerin akış enjeksiyon/amperometrik analizi için tasarlanmaktadır [89]. Schulze ve ark (2002), asetilkolinesterazın kullanıldığı ekran baskılı biyosensör geliştirmiştir ve gıda örnekleri diğer yöntemlerle kıyaslanarak değerlendirilmiştir [90]. Geleneksel analitik yöntemler ile kıyaslandığında daha tutarlı sonuçlar saptanmıştır. Ekran baskılı biyosensörler kolay bir yöntem olmasına rağmen, ekran yazıcının taşınma zorunluluğu kullanımını sınırlamıştır [89]. Deo ve ark (2005), organik fosfatlı pestisitlerin tayini için yaptıkları çalışmalarla amperometrik biyosensörleri yapmışlardır [91].

Bir biyosensörün biyoaktif tabakasındaki reaksiyonlar oldukça kompleks bir kinetiğe sahip olurlar. Amperometrik esaslı bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi şekil 1.4'te verilmektedir.



Şekil 1.13 Amperometrik esaslı bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi

1.6.2.4. Potansiyometrik Biyosensörler

Potensiyometri tayinde, genellikle biyoreseptör içeren bir elektrokimyasal hedef içerisinde ya bir ürünün elektrokimyasal aktivitesi ya da elektrokimyasal reaksiyondaki bir tepkimenin aktivitesinin gerilimi hesaplanmaktadır. Potensiyometrik ölçümler net akım akışı olmayan bir elektrot sürecinden oluşur. Bir elektrot yüzeyinde yük fazlalığı birikimi neticesinde elektrot üzerinde önemli miktarda gerilim oluşumu prensibiyle çalışır. Potansiyometrik biyosensörler, uygun biyoreseptörler ve uyumlu transdüserler kullanarak, bir iyonun iyonofora bağlanmasından kaynaklanan elektriksel gerilimdeki değişiklikleri takip edilebilmektedir [85].

Pestisit tespitinde elektrokimyasal ölçüm çeşitleri, potansiyometrik ölçüm ve amperometrik ölçüm çalışmaları birbirine benzerler. Mulchandani ve ark (1998) tarafından yapılan çalışmada, potansiyometrik biyosensör kullanarak organik fosfat esterlerini biyolojik bir katalizör etkili organofosfor hidrolaz tepkimesi ile analiz etmişlerdir [91].

1.6.2.5. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler biyokatalizör ve hedef analitin birleşimde oluşan reaksiyonun absorbans, yansıma, yayılma, lüminesans ve floresan gibi farklı optik ilkeler ve teknikler ile değerlendirilmesi üzerine temellenir. Optik biyosensörler sensör üzerinde ışığın kırılma indisi farklaşmasının tespiti hedefiyle kaybolan alan esasına dayanmaktadır [93].

1.6.2.6. Kolorimetrik Biyosensörler

Kolorimetrik biyosensörlerde bir kromojenik materyalin bir renk açığa çıkarmak için kullanıldığı sistem vardır. Optik tanımadan farklı olarak genellikle mekanik bir çeviricinin, çıplak gözle takibiyle yapılır. Fenolik bileşikler ve pestisitler için kolorimetrik tabanlı çevirici mekanizması ile hızlı ve kolay uygulanabilir çevresel analizleri belirten bazı denemeler mevcuttur [77]. Türkiye'de; NANObiz A.Ş. firması tarafından geliştirilen, ekolojik izleme yapan Şenyurt adlı fenol sensörü (Şenyurt 2008) ve Sensobiz firması tarafından geliştirilen, süt pastörizasyon değerlerini izleme yapan Karakaş alkalın fosfataz sensörü (Karakaş 2009) kolorimetrik biyosensörlere örnek

çalışmalardır. Bu sensörler tek kullanımlık sensörler olup, alternatifleri uzun zaman alıcı ve laboratuvar temelli yöntemlerdendir [65, 85].

1.6.2.7. Termal Biyosensörler

Termal transdüserlere sahip biyosensörler, enzim ya da mikroorganizmaların katalizlediği bir kimyasal tepkimede ısı şeklinde meydana gelen enerji farklanmasının izlenmesi üzerine temel alınmıştır [65].

1.6.2.8. Piezoelektrik Biyosensörler

Piezoelektrik esaslı transdüserler çoğunlukla immünosensörlerde uygulanır ve antijen veya antikörlerin bir kristal yüzeyine tutuklanması ile oluşturulmaktadır. Bu biyolojik bileşenlerle analit arasındaki bağlantı, işleme alınan kristalin titreşiminin izlenmesinin sinyale dönüşümü saptanmaktadır [85].

1.7. Biyosensörlerin Genel Uygulamaları

Biyosensörler kolay kullanım özellikleri, yüksek duyarlılık ve yerinde eş zamanlı ölçümlere uygulanma potansiyelleri sebebiyle, tıp, medikal, çevresel denetleme, genetik, otomasyon savunma sanayi ve gıda kalite kontrol gibi geniş çalışma alanlarına sahip olmaktadır [95].

Son zamanlarda nokta-tespit (POC) biyosensör teknolojileri sayesinde hastanelerde kullanılan teşhis cihazları ortaya çıkmaktadır. Taşınabilir ve insan vücuduna implante edilebilen cihazlar teknolojik ilerlemelerde odak noktası olmuştur. Şeker hastalığı izleme, gebelik testi, hepatit testleri, erken teşhis tarama testleri, bulaşıcı hastalık testleri, HIV, pıhtılaşma testleri, yapay organ takip testleri ve doğurganlık testi gibi en sık kullanılan POC biyosensör sistemleri mevcut olmaktadır [96].

Askeri sektör için biyosensör örneği Biotrace (biyoluminesans sistemleri çalışmasında uzmanlaşmış) ve Smiths Group'un Greaseby (algılama sistemleri çalışmasında uzmanlaşmış) tarafından geliştirilmektedir. Bu biyosensörün TIGER set-up seti iki aşamalı bir süreci ve 2 dakikadan az sürede toksik maddeler tayin edildiği belirtilmektedir. Bilimsel çalışmaları benzer şekilde olan adenosin trifosfat (ATP) luminesans (Sadana 2006) patentli uygulamada olan bir sistem oluşturmaktadır [95].

Biyosensörler pestisitlerin ölçüldüğü HPLC/DAD, LC/MS/MS ve GC/MS gibi ileri kimyasal analiz metotları ile kıyaslandığında bazı avantajlar ve dezavantajlar mevcuttur Tablo 1.5’de biyosensörlerin avantaj ve dezavantajları verilmektedir [97].

Tablo 1.5. Biyosensörlerin avantaj ve dezavantajları [97].

Avantajları	Dezavantajları
Yüksek duyarlık, Kısa ölçüm zamanı, Gereksinime göre işlem akışı, Ölçüm ve analiz maliyetlerinde düşme, Otomatik ölçüm ve uyarlama sistemlerinin kullanılması, Multisensör sistemlerinin geliştirilmesi.	Biyobileşenlerin kısa ömürlü olması, Biyosensör hazırlamanın zaman alması, Moleküler biyolojik ilerlemeler konusunda yeterli bilgi donanımı olmaması, Biyokompatibilite sorunları, İmplant edilebilen sensörlerin steril tutulabilme sorunu, Mikroorganizmaların genetik kararlılığının düşük olması.

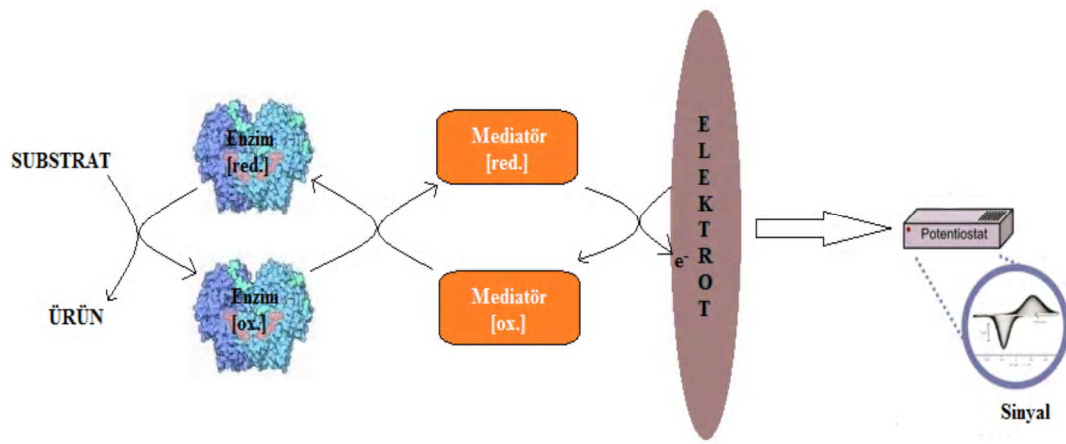
1.8. Enzim Temelli Biyosensörler

Elektro aktif türlerin konsantrasyonları potansiyometrik ya da amperometrik cevapla izlenir ve elektrokimyasal sinyal değerleri, substrat konsantrasyonunun hesaplanması için ilişkilendirilebilirler. Enzim temelli biyosensörlerin en önemli iki bölümü enzim ve elektrot kısımlarıdır. Enzim elektrotunda, elektrot materyali seçiminde elektriksel iletkenliğin yüksek olmasına ve sertliğe dikkat edilmelidir. Bu sebeple, enzim biyosensörlerinde kullanılan elektrotlar genelde yaprak ya da çubuk şeklinde; platin, altın, grafen, karbon gibi katı destek materyallerinden oluşur [98].

Kullanılacak enzimin tercihi ise, gerçekleşecek reaksiyon ve analite göre yapılır. Oksidoredüktaz enzimleri (Glukoz oksidaz, üreaz, alkol dehidrogenaz, peroksidaz, katalaz, bilirubin oksidaz ve laktat oksidaz vb.) amperometrik enzim elektrotu uygulamaların da sıklıkla tercih edilen enzimlerdendir. Enzimle geliştirilmiş elektrot sistemlerinin fazla bileşenli sistemlerde, hızlı analize olanak sağlamaları ve yüksek

hassasiyette ölçüm değerleri gibi avantajları nedeniyle ekoloji, sağlık, analitik kimya, gibi alanlarda geniş uygulama sahası bulunmaktadır [99].

Enzim temelli bir amperometrik elektrot, kimyasal seçici tabaka için bir enzim, sinyale dönüştürücü için bir elektrot, elektrotun bağlı olduğu bir sinyal yükseltici ve sonuçların okunacağı bir ekran sisteminden oluşmaktadır (Şekil 1.14) [99].

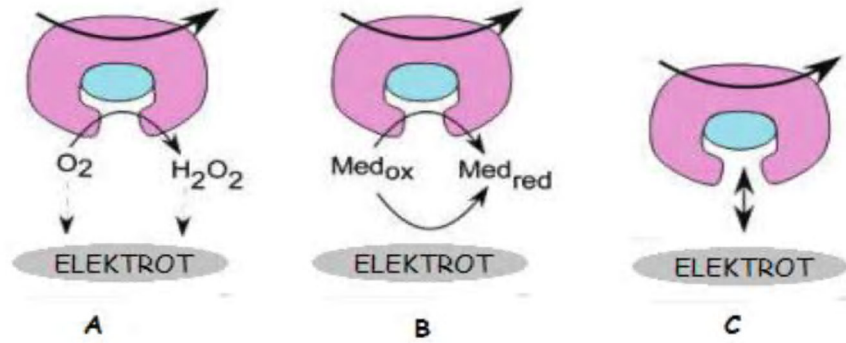


Şekil 1.14. Bir enzim elektrotunun temel kısımları.

1.8.1. Amperometrik Biyosensörler Jenerasyonları

Amperometrik biyosensörlerin oluşumu için, elektron alışverişinde görevli redoks enzimi ve elektrotlar arasındaki elektronik bağlantı ilişkisi 3 kuşak şeklinde gelişmektedir:

- Birinci kuşak amperometrik elektrotlar: Enzim substratının ya da ürünün elektro aktivitesi üzerine temellenir.
- İkinci kuşak amperometrik elektrotlar: Redoks medyatörlerinin serbest halde ya da immobilize edilmiş biyomoleküllerin kullanımı üzerine temellenir.
- Üçüncü kuşak amperometrik elektrotlar: Enzimin redoks aktif bölgesi ile elektrot yüzeyi arasında direk elektron taşınması üzerine temel oluşturur. Amperometrik elektrotların geliştirilmesinde çeşitli yaklaşımlar Şekil 1.15’de belirtilir [100].



Şekil 1.15. Amperometrik enzim elektrotu jenerasyonları a) I. Nesil Amperometrik elektrotlar, b) II. Nesil Amperometrik elektrotlar, c) III. Nesil Amperometrik elektrotlar [103].

I. Nesil biyosensör jenerasyonlarında dezavantajlarının en önemlisi çok yüksek potansiyel uygulanmasıdır. Bu problem küçük redoks aktif moleküller olan, enzimin redoks aktif kısmı ile elektrot yüzeyi arasında elektron taşınmasını gerçekleştiren medyatörlerin (ferrosen türevleri, ferrosiyamid, iletken organik tuzlar ve kinonlar) seçimi ve kullanımı ile çözülür.

II. Nesil biyosensör jenerasyonlarında birçok redoks enzimi temelli elektrotlar için medyatörlerin kullanımı uygulanan potansiyeli düşürür. Bunun yanı sıra, medyatörler kullanıldıkları elektrotlarda lineer cevap aralığını yükselir. Ayrıca glukoz elektrotlarında, bilinen elektrot kullanım ömrünü uzatırlar çünkü enzim aktivitesi için zararlı olan hidrojen peroksit medyatör kullanıldığı durumda üretilmez. Dezavantaj olarak medyatörler sadece redoks enzimlerine bağ kurarak enzim ve elektrot arasında elektron transferini sağlamaz bununla beraber çeşitli reaksiyonlara da sebep olmaktadır [101].

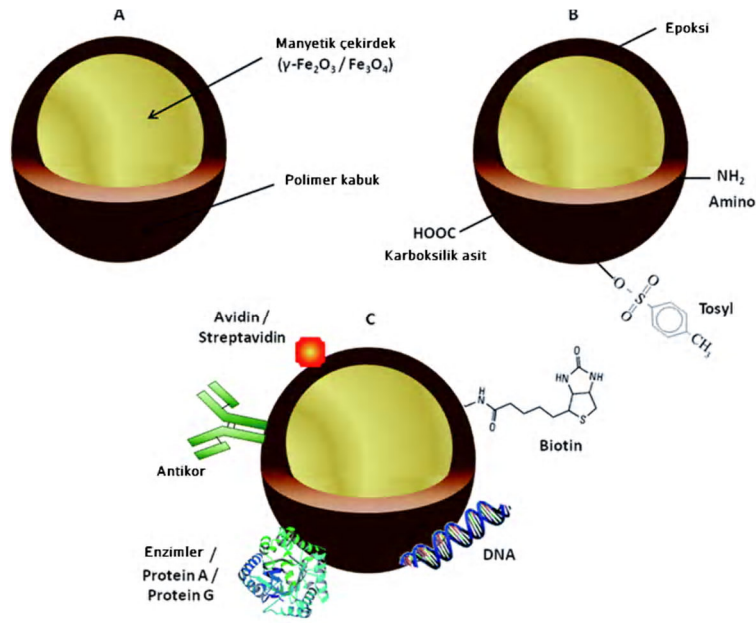
III. Nesil biyosensör jenerasyonlarında elektron transferi substratın ürüne katalitik dönüştürülmesi ile ilişkilendirilmektedir. Reaksiyonda görevli enzimi elektrot ve substrat molekülü arasında medyatör bulunmadan elektron transferini fazlalaştırarak, bir elektro katalizör görevi üstlenilmektedir. Bu tür biyosensörler, çoğunlukla üstün seçicilik gösterirler, çünkü başka reaksiyonlara başlatmadan enzimin redoks potansiyeline eş değer potansiyelde çalışırlar. Biyomolekül ve elektrot yüzeyi arasındaki ilişkinin kuvvetli olması bu tür biyosensörlerin hassaslığını olumlu etkiler. İlerlemiş çalışmalar yüksek performanslı amperometrik biyosensörler için redoks enzimi ve

elektrot arasında elektron transferinin arttırılması temeline önem verilir. Bu sistemlerin geliştirilebilir başka bir özelliği ise, doğrudan elektron transferine dayalı enzim temelli amperometrik araçlara hedef alınır [102].

1.8.2. Manyetik Boncuklar ve Nanopartiküller

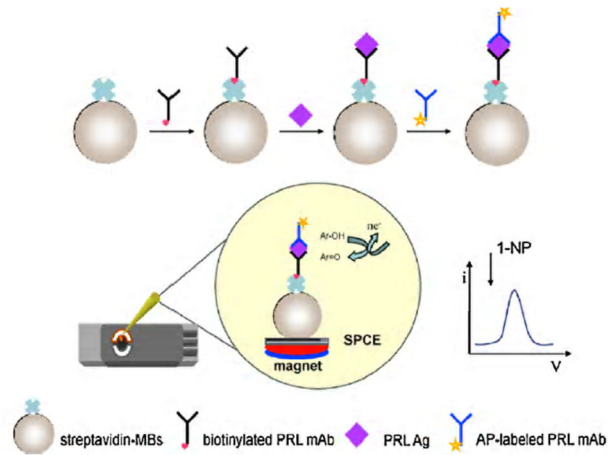
Son yıllarda, mikro ve nanomateriyallerin elektrokimyasal biyosensörlere aktif kullanımı oldukça görülmektedir. Bu alanda manyetik partiküllerin sisteme katılması yeni jenerasyon biyosensörlerde özel ilgi odağı olmuştur. Manyetik partiküller yıllardır satışıdır (örneğin, BioMag®, Dynabeads®, Adembeads® ve SiMAG®) ve laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Özellikle bir sıvıdan saflaştırılmak istenen biyolojik örneklerin eldesinde kullanılmaktadırlar. Şekil 1.16'da verildiği üzere, manyetik materyallerden (demir, nikel, kobalt, neonidim-demir-boron, samaryan-kobalt veya magnetit) oluşan inorganik bir kor içerir. Bunun üzerinde polisteren, dekstran, poliakrilik asit veya silikadan oluşan bir polimer tabaka bulunmaktadır. Bu tabaka, fonksiyonel gruplarla (örneğin amino ve karboksilik asit) modifiye edilir. Bu fonksiyonel gruplar sayesinde, manyetik partiküllerin yüzeyine peptidler, küçük moleküller, proteinler, antikorlar ve nükleik asitler bağlanabilmektedir [106].

Manyetik partiküllerin büyüklükleri birkaç nanometre (5–50 nm) ile birkaç mikrometre (1–10 µm) arasında değişir. Bu partiküller, etkili transport, hızlı ölçüm kinetikleri, bağlanma özgülüğünün arttırılması ve işaretleyici olarak etki eder. Küçük magnetler tarafından sıvı ortamdan çekilerek rahatlıkla toplanıp ayrıştırılabilir. Magnet çekilince tekrardan dağılırlar ve bu toplama ve dağılma ile istenmeyen örnek içerikleri rahatlıkla yıkanır ve uzaklaştırılır. Partiküller nükleik asit, protein, virüs, bakteri ve hücrelerin immunomanyetik seperasyonlarında kullanılır [103].



Şekil 1.16. Manyetik partiküllerin şematik gösterimi (A), fonksiyonel gruplarla aktivasyon (B) ve konjuge biyolojik moleküler (C) [103].

Biyosensörler ile ilgili pek çok çalışmada, screen printed elektrot (SPE) temelli biyosensörlerin geliştirilmesinde önemli noktanın elektrot yüzeyi üzerine aktif formda biyolojik reseptörün immobilizasyonu olduğunu gösterilmektedir [104, 105, 106]. Şekil 1.17’de magnetize karbon baskılı elektrotlar üzerinde (SPE) streptavidinle modifiye manyetik partiküllere dayalı immünosensör uygulaması gösterilmektedir. Burada sandeviç tip immun ölçüm ile antijen miktarı ölçülmektedir. Bunun için öncelikle biyotinlenmiş yakalayıcı monoklonal antikor streptavidinle modifiye partikül üzerine bağlanmıştır. Sonrasında ortama antijen ilave edilerek, antijenin antikora bağlanması beklenmiş ve devamında alkalen fosfatase işaretli ikincil antikor ortama konularak antijene bağlanması sağlanmıştır. Sonuç olarak modifiye edilmiş manyetik partiküller altında magnet bulunan SPE’ler üzerine konularak stabilize edilmiş ve stabilize edilmiş modifiye partiküller üzerine enzimin substratı olan 1-NP (1-naftilfosfat) eklenerek, açığa çıkan elektro aktif ürün (1-naftol) differansiyel pulse voltametri ile ölçülmektedir [107].

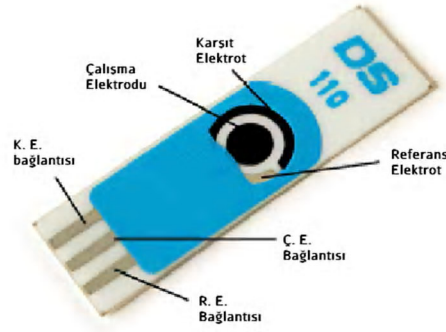


Şekil 1.17. Manyetik boncukların modifikasyonu ve baskılı elektrotlar üzerinde biyosensör ölçümleri [107].

1.8.3. Baskılı Elektrotlar (Screen-Printed Electrodes: SPE)

Baskılı elektrotlar son zamanlarda biyosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve basitlik, hızlilik ve ucuzluk bakımından ümit verici olan malzemelerdendir. Baskılı elektrot temelli kullanılıp atılabilen biyosensörler biyomoleküllerin, pestisitlerin, antijenlerin, DNA, mikroorganizmalar ve enzimlerin miktar tayinlerinde yeni ufuklar açmaktadırlar. Ayrıca taşınabilir cihazlarda minyatürize edilerek kullanılabilinmektedirler. Özellikle elektrokimyasal sensörlerin minyatürizasyonunda sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bu durumun en önemli avantajı, örnek hacminin birkaç mikrolitreye kadar küçültülmesidir. Bu da bu cihazların diyagnoz sistemlere kolaylıkla entegre edilmelerini sağlamaktadır. SPE yüzeyleri çok farklı analitleri ölçmek amacıyla kolaylıkla modifiye edilir. Bu sayede birçok analit az miktarlarda da olsa ölçülür [108].

SPE’lerde çalışma elektrodu karbon, altın, platin, gümüş veya karbon nanotüplerden yapılmaktadırlar. Elektrodun yapısında bir çalışma, karşıt ve referans elektrot bulunur. Genellikle çalışma elektrotu ve karşıt elektrot aynı maddeden yapılırken, referans elektrot farklı maddeden yapılmaktadır. Genellikle gümüş kullanılır (Şekil 1.18). Bu kombinasyon elektrokimyasal ölçümlerde kullanılmaktadır.



Şekil 1.18. SPE yapısı.

Amperometrik biyosensörlerin kullanım alanları, klasik elektrotların SPE'lerle değiştirilmesi sayesinde daha da genişlemiştir. SPE'ler özellikle eser seviyelerdeki madde analizlerinde bellek etkilerinin ortadan kaldırılması ve onların yerinde in situ tayin için cazip avantajları biyosensör çalışmalarına eklemiştir. SPE'ler yapısında düzlemsel seramik veya plastik destekler gibi farklı materyallerin baskısını içerir. Bu da SPE'lerin büyük esneklikte olmasına yardımcı olur [108].

Bu çalışmada; "Printed-ECELISA cihazı, ve Dropsens 8x ve 96x SPE'ler ile peynir suyunda BKM-7 tayini, elektrokimyasal sisteme uyarlanmış, bizim tarafımızdan geliştirilen manyetik boncuklara dayalı elektrokimyasal ELİZA (ECELISA) kit içeriği ile yapılmıştır.

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneylerde Kullanılan Materyaller

2.1.1. Kimyasallar

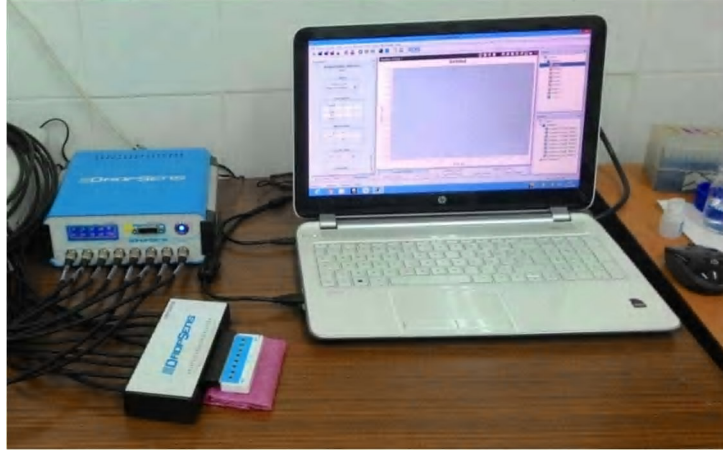
Deneylerde kullanılan başlıca kimyasal maddeler, Merck, Aldrich, Fluka, Sigma, Abcam, Abnova, eBioscience, Milipore Amicon, Dynabeads, Thermo gibi firmalardan ithal edilen antijen, antikorlar ve reaktifler olup, kimyasallar analitik saflıkta bulunmaktadır.

2.1.2. Araç, Gereç ve Cihazlar

Deneyler sırasında kullanılan araç, gereçler ve cihazlar Tablo 2.1, Şekil 2.1, Şekil 2.2, Şekil 2.3 ve Şekil 2.4’de verilmektedir.

Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan araç, gereçler ve cihazlar.

CİHAZLAR
Dropsens–DRP-Cast8X
Dropsens-DRP-Cast96x
Vortex mixer-Labnet International, Inc.
pH metre-Mettler Toledo
Hotplate& Stirrer-HSD 180 MTOPS
Hassas Tartı-OHAUS (Item PA214C)
Su Cihazı-Q-POD-Lod No: F4CA33864 (saf-distile su)-MILLIPORE
EPPENDORF mikropipet takımı ve EPPENDORF tüpler:1 ml, 1.5 ml, 2 ml, 4 ml
Santrifüj-Sigma 2–16 PK



Şekil 2.1. Baskılı ECELISA Sistemi: Potansiyostat, elektrot bağlantıları, 8x elektrot ve bilgisayar bağlantısı



Şekil 2.2. Deneylerde kullanılan santrifüj cihazı



Şekil 2.3. Çalkalamalı vorteks

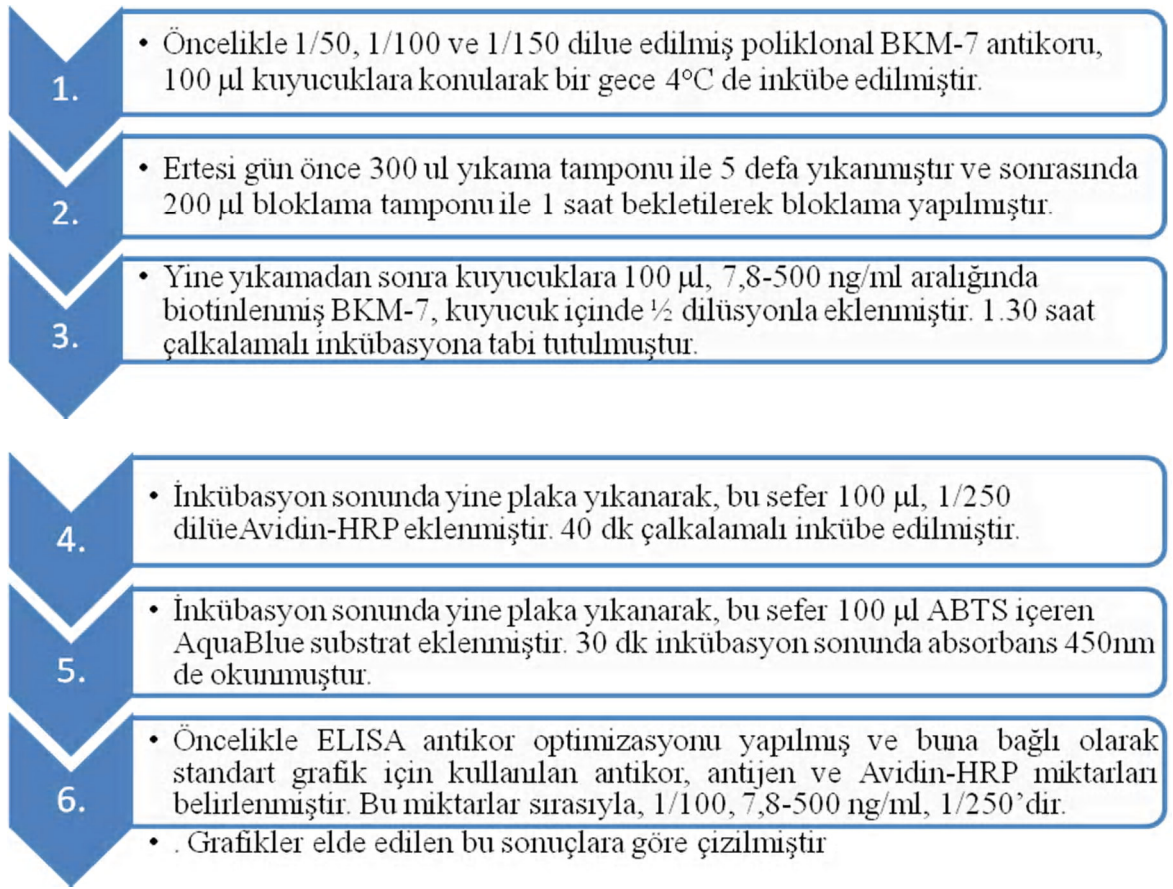


Şekil 2.4. Manyetik boncukları toplama ve yıkamada kullanılan magnet

2.2. Yöntemler

2.2.1. Biotin-BKM-7 Spektrofotometrik Direk ELİZA Çalışma Metodu

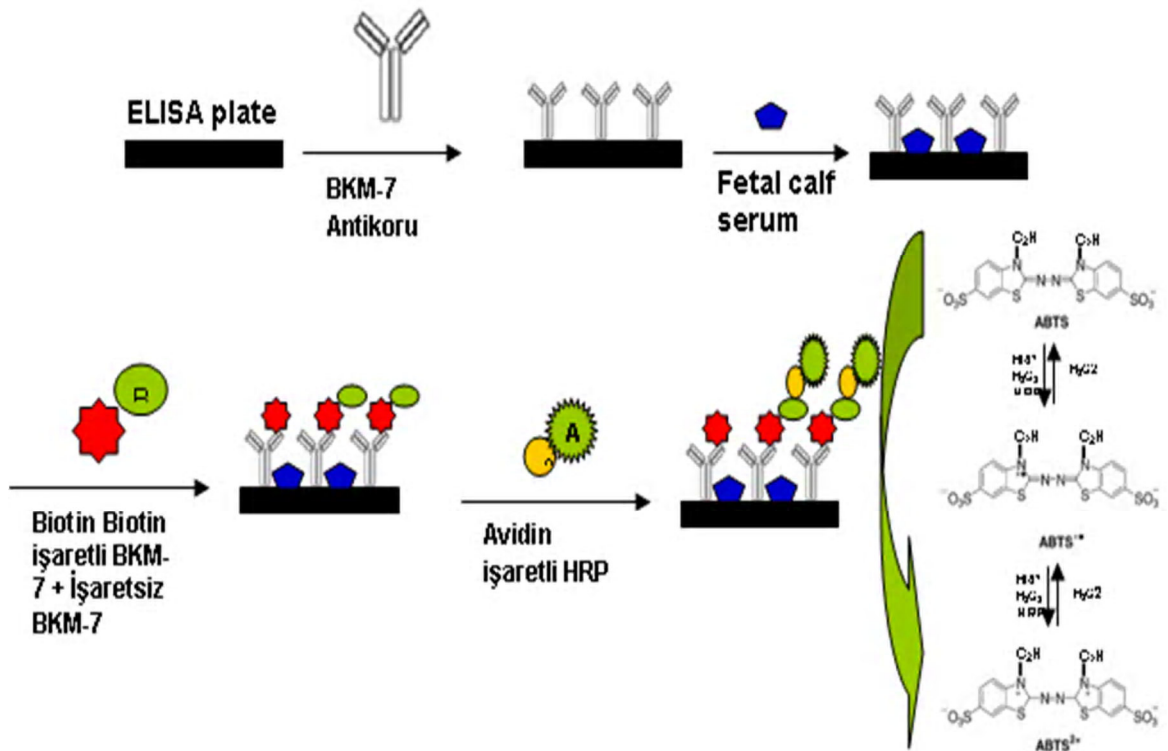
Şekil 2.5’de biotin işaretli BKM-7 ile yapılmış direk ELİZA çalışma metodu verilmiştir. Bu çalışma yarışmalı ELİZA çalışması için gerekli olan optimum antikor ve antijen miktarlarının belirlenmesi için yapıldı.



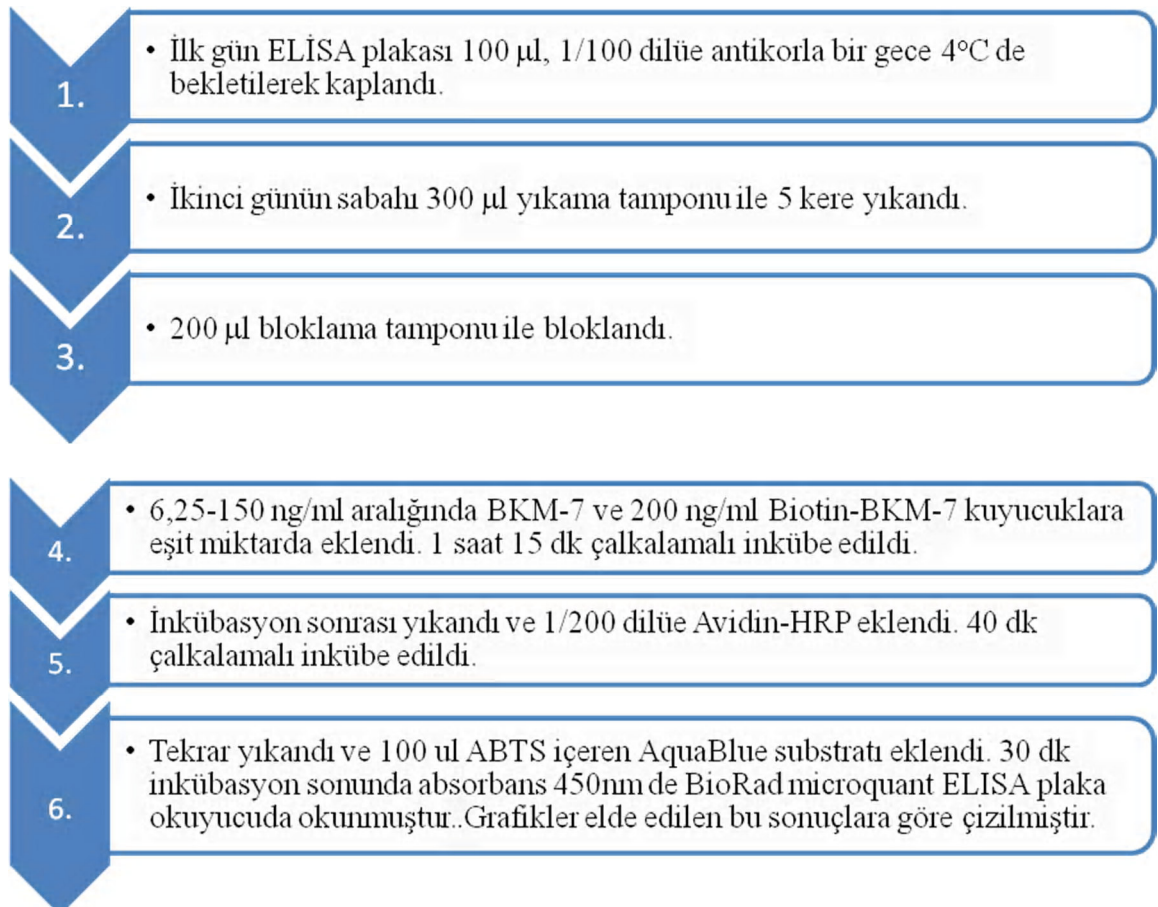
Şekil 2. 5. Biotin-BKM-7 Direk ELİZA çalışma metodu diyagramı

2.2.2.Yarışmalı BKM-7 ELİZA Metodu

Yarışmalı BKM-7 metodunun şematik gösterimi ve çalışma diyagramı Şekil 2.6 ve Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.6. Yarışmalı BKM-7 metodunun şematik gösterimi



Şekil 2.7. Yarışmalı BKM-7 metodu diyagramı

Standart grafiği çizebilmek amaçlı, bu metotta K r (Blk), non-spesifik bağlanma (NSB) ve maksimum bağlanma (Bo)  alışılmıştır.

K r: Kaplama ve bloklama tamponu, Avidin-HRP ve substrat Aqua-Blue bulunmaktadır. BKM-7 antikoruna eklenmemiştir.

Non-spesifik Bağlanma: Kaplama ve bloklama tamponu, Avidin-HRP, Biotin-BKM-7 ve substrat Aqua-Blue bulunmaktadır. BKM-7 antikoruna eklenmemiştir.

Maksimum Bağlama: Kaplama ve bloklama tamponu, Avidin-HRP, en yüksek Biotin-BKM-7 konsantrasyonu ve substrat Aqua-Blue bulunmaktadır. BKM-7 antikoruna eklenmiştir.

Yarışmalı BKM-7 standart grafiği Cayman Chemicals, EIA-Double Excel  alışma programında çizilmiştir.

2.3. Baskılı Elektrokimyasal ELİZA (PrintECELISA)

2.3.1. Dönüşümlü Voltametri

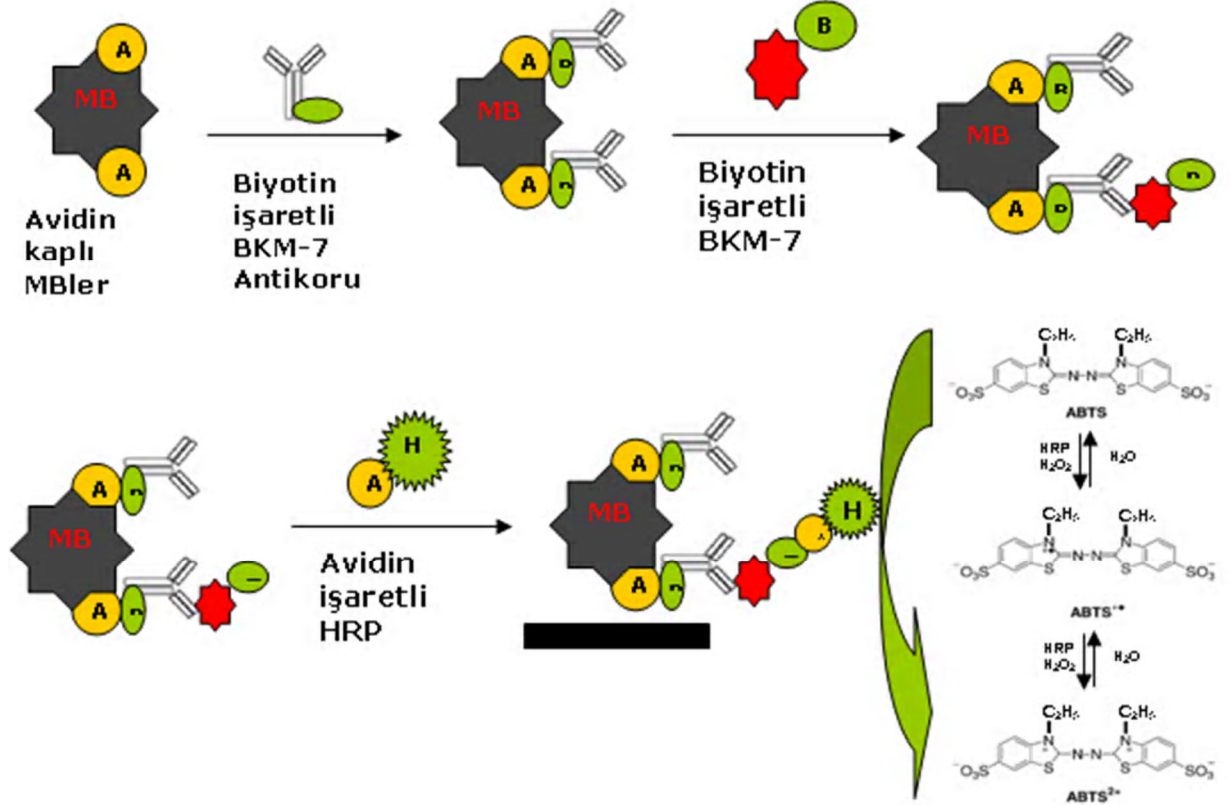
HRP substratı 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt (ABTS)'in oksidasyon ve redüksiyon piklerini belirlemek amacıyla, dönüşümlü voltametri Ag/AgCl referansa karşı, 50 mVs⁻¹ tarama hızıyla çekildi.

2.3.2. Manyetik Boncuklar (MBs) ile Amperometrik Direk Biotin-BKM-7 Biyosensör Tayin Metodu

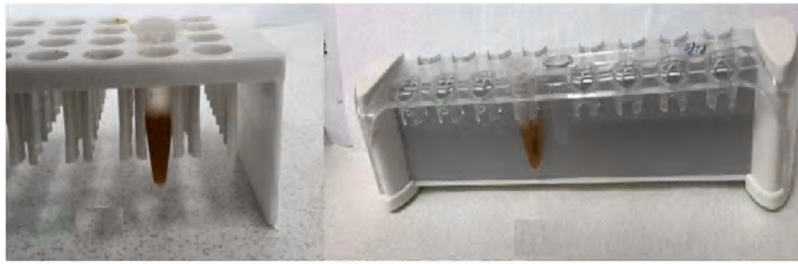
Metot, streptavidin (avidin)-biotin konjugasyonu prensibine dayalı direk ECELISA protokolü üzerinden yürütüldü.

Direk Biotin-BKM-7 metodunun şematik gösterimi şekil 2.8'da verilmiştir. Bu  alışma, asıl biyosensör protokolü olan yarışmalı ECELISA  alışmaları için optimizasyon koşullarını belirlemek amacıyla yapıldı. Direk ECELISA çalışmalarında 0,1 mg/ml MB ve 1,46  g/ml poliklonal BKM-7 antikor konsantrasyonu kullanıldı. Okumalar 8x elektrot için toplam 20  l'de ve 96x için 80  l'de yapıldı.

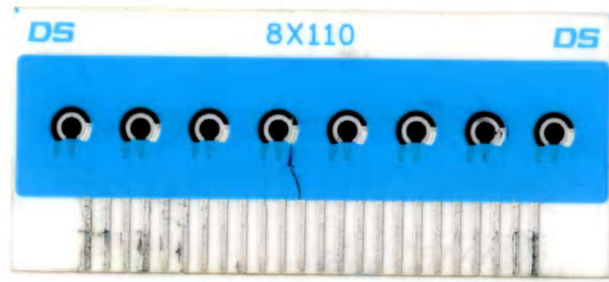
Çalışma sırasında kullanılan aşağıda 16'lı toplama magneti (Şekil 2.9), 8x DRP SPE (Şekil 2.10) ve 96x DRP SPE elektrotları resimleri Şekil 2.11'de verilmektedir.



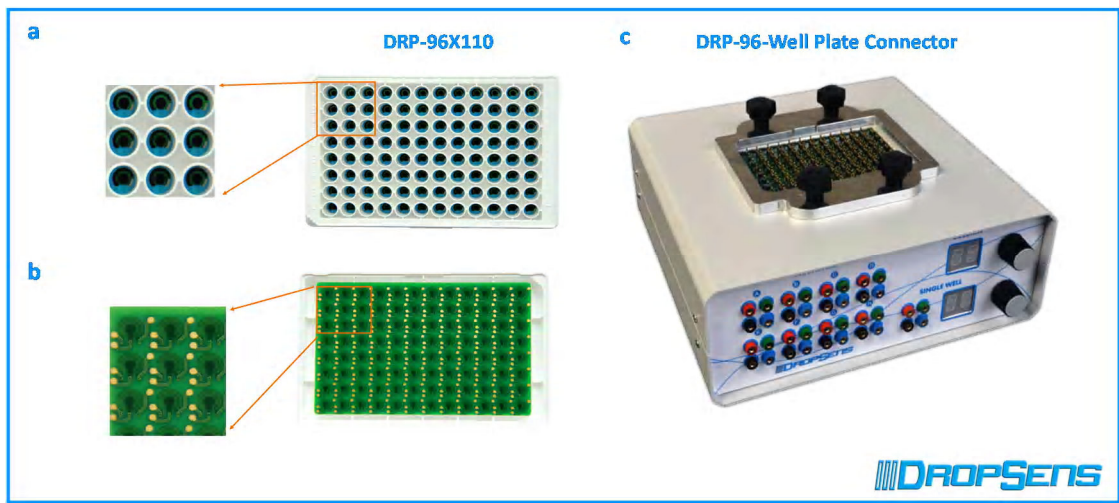
Şekil 2.8. Yarışmalı BKM-7 metodunun şematik gösterimi



Şekil 2.9. Eppendorf içinde dağınık ve 16'lı magnet üzerinde toplanmış modifiye manyetik partiküller.



Şekil 2.10. Dropsens 8x110 amperometrik biyosensör elektrotu.



Şekil 2.11. Dropsens 96x110 amperometrik biyosensör elektrotu ve potansiyostat konnektörü

2.3.3. Direk ECELISA ile Amperometrik BKM-7 Biyosensör Optimizasyonu

2.3.3.1. Farklı Çalışma Tamponu Denemeleri

Farklı çalışma tamponları ile elde edilecek sonuçları karşılaştırmak amacıyla elektrokimyasal ELİZA'da (ECELISA) iki farklı tamponla deney yapıldı. Çalışmada kullanılan MB ve BKM-7 antikor miktarı sırasıyla 0.1 mg/ml ve 1,46 µg/ml'dir. Uygulama potansiyeli olarak 150 mV sisteme uygulanmıştır. Okumalar 20. dk da gerçekleştirildi.

Tampon 1: 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4

Tampon 2: 0.01M fosforik asit tamponu, pH:7.4

2.3.3.2. Uygulama Potansiyeli Optimizasyonu

Sistem uygulama voltajını bulmak amacıyla, 50, 100, 150, 200 ve 300 mV uygulama potansiyelleri ile amperometrik ölçümler yapıldı. Bu çalışma aralığı Zor ve ark. (2011 ve 2012)'nın bulduğu sonuçlara göre seçildi [109, 110]. Kullanılan MB ve BKM-7 antikor miktarı sırasıyla 0.1 mg/ml ve 1,46 µg/ml'dir. Okumalar 20. dk da gerçekleştirildi.

2.3.3.3. Streptavidin Kaplı Manyetik Boncuk Konsantrasyonu Denemeleri

Çalışmada kullanılan streptavidin kaplı MB konsantrasyonunun etkisi farklı miktarlarda MB'ler kullanılarak yapıldı. Bunun için 0.03, 0.1, 0.2 mg/ml konsantrasyonlarında ki MB'ler çalışma ortamı içine konulmuş ve sonuçlar değerlendirildi. BKM-7 antikor miktarı 1,46 µg/ml'dir. Uygulama potansiyeli olarak 150 mV sisteme verildi. Okumalar 20. dk da gerçekleştirildi.

2.3.3.4. HRP Substratları ABTS ve H₂O₂'nin Amperometrik Optimizasyonu

Bu amaçla, HRP substratları ABTS ve H₂O₂'in farklı konsantrasyonları hazırlanarak, HRP aktivitesi üzerine etkisi MBs dayalı biotin-BKM-7 amperometrik sistemde ölçüldü. Bunun için ABTS ve H₂O₂'in sırasıyla 0.76 ve 0.292 mmol/l (1/5 dilüsyon); 1.9 ve 0.73 mmol/l (1/2 dilüsyon); 3.8 ve 1.46 mmol/l (dilüsyonsuz) konsantrasyonlar denendi. Ölçümlerde Biotin-BKM-7 konsantrasyonu 10-200 ng/ml aralığındadır. BKM-7 antikor ve MB miktarları sırasıyla 1.46 µg/ml ve 0.1 mg/ml'dir. Okumalar 150 mV'da 20 dk sonunda gerçekleştirildi.

2.3.3.5. HRP Aktivitesi Okuma Süresi Tespiti

HRP aktivitesi okuma süresi tayininde kullanılan Biotin-BKM-7 konsantrasyonları 0,5-250 ng/ml arasındadır. Antikor, MB, Avidin-HRP konsantrasyonları sırasıyla 1,46 µg/ml, 0,1 mg/ml, 1/400 dilüsyondur. Substrat konsantrasyonu 1,9 mmol/l ABTS + 0,73 mmol/l H₂O₂'dir. Okumalar 10, 20 ve 30. dk'larda yapıldı. Uygulama potansiyeli 150 mV'dur.

2.3.3.6. Poliklonal BKM-7 Antikor Konsantrasyonu Optimizasyonu

Poliklonal BKM-7 antikor konsantrasyonu optimizasyon çalışmasında Biotin-BKM-7 miktarları 10-300 ng/ml arasındadır. Denenen antikor konsantrasyonları 0.78, 1.46, 2.92

$\mu\text{g/ml}$ 'dir. Denenen çalışma aralığı streptavidin kaplı $1\ \mu\text{m}$ çaplı MB'ların biotinli antikor bağlama kapasitesine ($20\ \mu\text{g}$ antikor/ mg MB) göre belirlendi. MB ve Avidin-HRP konsantrasyonları sırasıyla $0,1\ \text{mg/ml}$ ve $1/400$ dilüsyondur. Substrat konsantrasyonu $1,9\ \text{mmol/l}$ ABTS + $0,73\ \text{mmol/l}$ H_2O_2 'dir.

2.3.3.7. Avidin-HRP Konsantrasyonu Optimizasyonu

Avidin-HRP konsantrasyonları optimizasyon çalışmasında $1/200$, $1/400$ ve $1/500$ HRP dilüsyonları son basamakta modifiye MB'ler içeren ependorflar içine konuldu. Çalışma ortamındaki MB, BKM-7 antikor ve Biotin-BKM-7 konsantrasyonları sırasıyla $0,1\ \text{mg/ml}$, $1,46\ \mu\text{g/ml}$ ve $200\ \text{ng/ml}$ 'dir. Substrat konsantrasyonu $1,9\ \text{mmol/l}$ ABTS + $0,73\ \text{mmol/l}$ H_2O_2 'dir. Okuma süresi $20\ \text{dk}$; uygulama potansiyeli $150\ \text{mV}$ 'dur.

2.3.3.8. Optimizasyonlardan Sonra Standart Grafikler Üzerinden Uygulama Potansiyeli Farkı Çalışmaları

Çalışma ortamında MB, antikor ve Avidin-HRP konsantrasyonları sırasıyla $0,1\ \text{mg/ml}$, $1,46\ \mu\text{g/ml}$ ve $1/400$ dilüsyondur. Biotin-BKM-7 standart aralığı $0,5-150\ \text{ng/ml}$ 'dir. Substrat konsantrasyonu $1,9\ \text{mmol/l}$ ABTS + $0,73\ \text{mmol/l}$ H_2O_2 'dir. Elektrot üzerine $10\ \mu\text{l}$ modifiye MB'lar ve $10\ \mu\text{l}$ substrat konularak okuma yapıldı. Okuma süresi $20\ \text{dk}$, uygulanan potansiyeller 50 , 150 ve $300\ \text{mV}$ 'dur.

Buraya kadar yapılan optimizasyon çalışmalarında 8x DRP SPE elektrotlar kullanılmıştır.

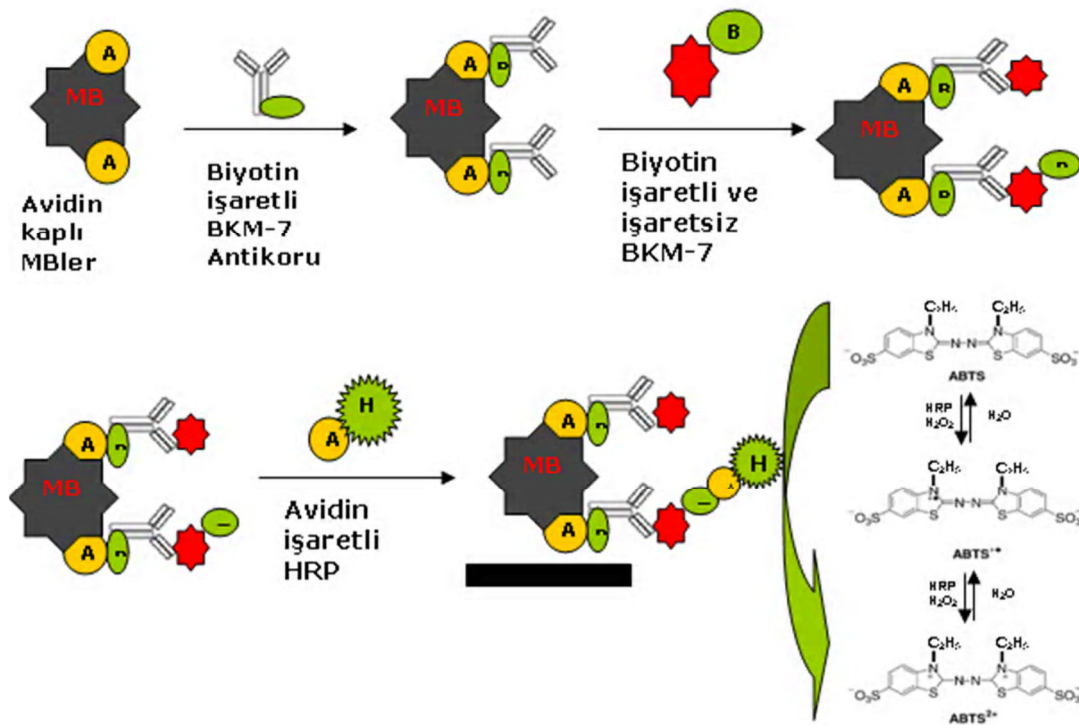
2.4 Optimize Edilmiş Koşullar Altında 96x DRP SPE Elektrotlarda BKM-7 Biyosensör Ölçümleri

Bu çalışmada Biotin-BKM-7 konsantrasyon aralığı $0,5-100\ \text{ng/ml}$ olarak tutuldu. Antikor, MB, Avidin-HRP konsantrasyonları sırasıyla $1,46\ \mu\text{g/ml}$, $0,1\ \text{mg/ml}$, $1/400$ dilüsyondur. Substrat konsantrasyonu $1,9\ \text{mmol/l}$ ABTS + $0,73\ \text{mmol/l}$ H_2O_2 'dir. Elektrot üzerine $40\ \mu\text{l}$ modifiye MB'lar ve $40\ \mu\text{l}$ substrat konularak, toplam $80\ \mu\text{l}$ 'de okuma yapıldı. Uygulama potansiyeli $150\ \text{mV}$, okuma $20\ \text{dk}$ 'da yapıldı.

2.4.1.Yarışmalı BKM-7 ECELISA Ölçümleri

Bu kısımda, daha önceki basamaklarda yapılan ve oluşturulan optimizasyon koşulları altında A1 tip inek sütü BKM-7 yarışmalı ECELISA metodu geliştirilmiştir. Bu amaç

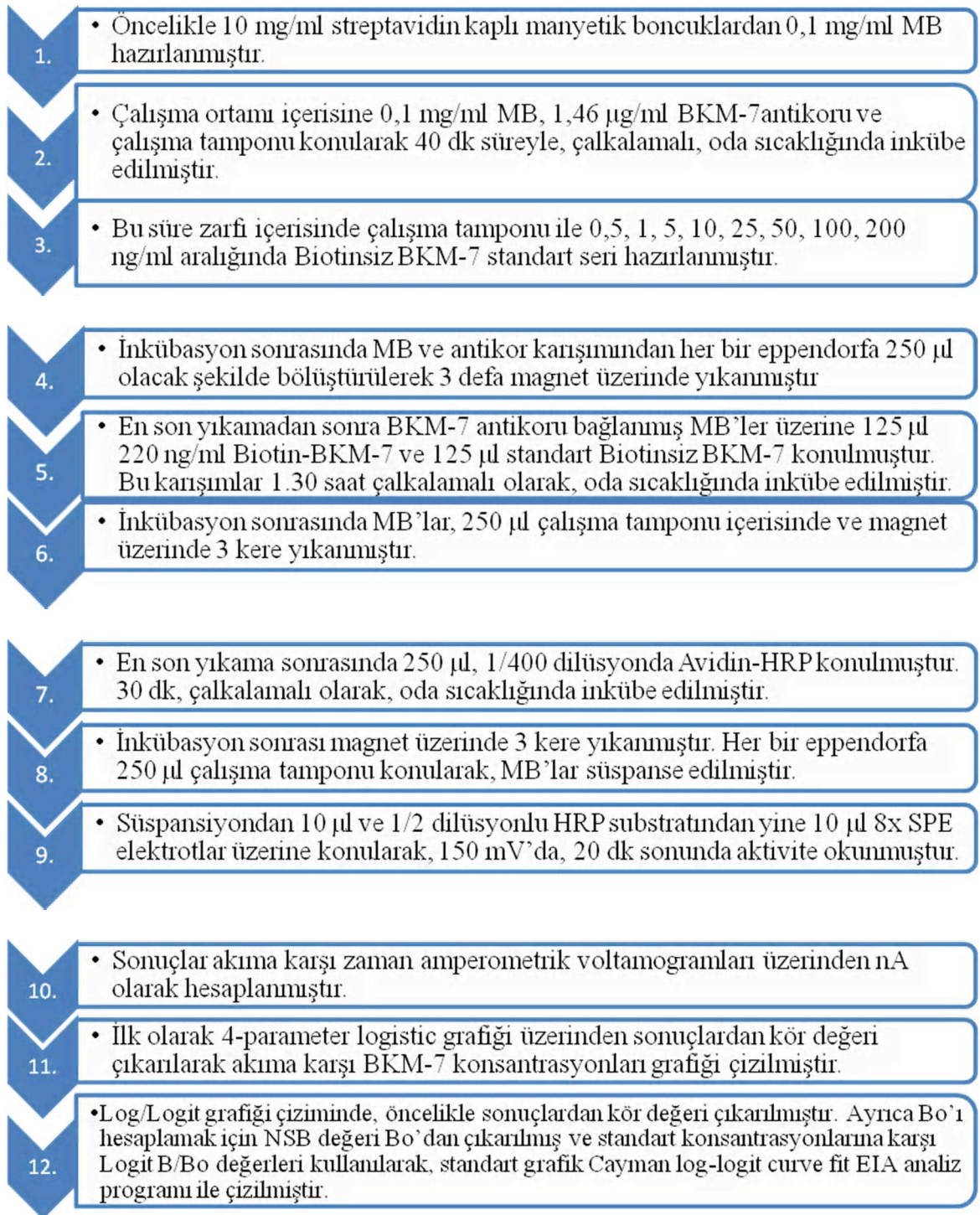
doğrultusunda yine avidin-biotin etkileşimine dayalı, yarışmalı ECELISA protokolü uygulanmıştır. Bu protokolde, poliklonal BKM-7 antikoruna yarışmalı olarak bağlanan biotin işaretli BKM-7'lere karşı, biotin işaretli BKM-7 konsantrasyonlarına dayalı sinyal eldesi prensibi kullanılmıştır. Sinyaller sisteme uygulanan sabit voltaja karşı değişen akım üzerinden toplamıştır. 8x ve 96x DRP ekran baskılı karbon elektrotlar (SPEs) kullanılarak amperometrik okumalar gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda geliştirilen uygulama prosedürü şekilsel olarak aşağıda verilmektedir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Yarışmalı ECELISA uygulama protokolü şematik gösterimi

2.4.1.1. 8x DRP SPE Üzerinde Yarışmalı BKM-7 ECELISA Metodu

8x DRP SPE'ler ile okumaları gerçekleştirilen yarışmalı ECELISA BKM-7 biyosensörü metodunun çalışma diyagramı Şekil 2.13'de verilmiştir.



Şekil:2.13. 8x DRP SPE'ler ile okumaları gerçekleştirilen yarışmalı ECELISA BKM-7 biyosensörü metodunun çalışma diyagramı

Kör: Sadece 1/400 Avidin-HRP ve 1,9 mmol/l ABTS + 0,73 mmol/l H₂O₂ bulunmaktadır.

Non-spesifik Bağlanma (NSB): 0,1 mg/ml MB, 220 ng/ml Biotin-BKM-7, 1/400 Avidin-HRP, ve substrat 1,9 mmol/l ABTS + 0,73 mmol/l H₂O₂ bulunmaktadır. BKM-7 antikoruna eklenmemiştir.

Maksimum Bağlama (B₀): 0,1 mg/ml MB, 220 ng/ml Biotin-BKM-7, 1/400 Avidin-HRP, ve substrat 1,9 mmol/l ABTS + 0,73 mmol/l H₂O₂ bulunmaktadır. 1,46 µg/ml BKM-7 antikoruna eklenmiştir.

Grafiği çizmek için

1. B₀ değerinden NSB değeri çıkarılmıştır. Çıkan değer düzeltilmiş maksimum bağlanma değeridir.
2. Daha sonra B/B₀ (Örnek veya standart bağlanması/Maksimum bağlanma) değeri hesaplanmıştır. Örnek veya standart bağlanmasının düzeltilmiş değerleride yine NSB değeri çıkarılarak bulunmuştur. Bu şekilde Log/logit grafiği çizilmiştir.

Logit fonksiyonu kesintisiz sigmoidal bir işlevdir ve aşağıdaki gibi gösterilir.

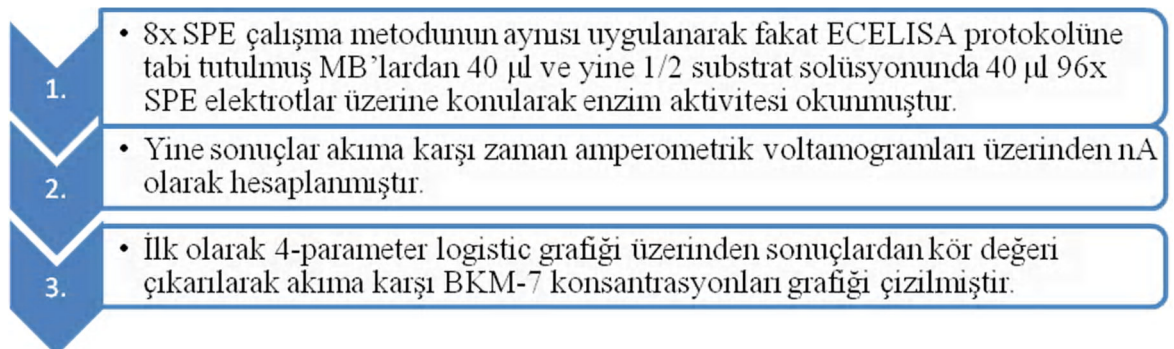
$$\text{logit } B/B_0 = \log_e [(B/B_0)/(1-B/B_0)] \quad (1)$$

ya da $\text{logit } Y = \log_e [1/(1 - Y)] \quad (2)$

nerede $Y = (B - \text{NSB})/(B_0 - \text{NSB}) \quad (3)$

2.4.1.2. 96x DRP SPE Üzerinde Yarışmalı BKM-7 ECELISA Metodu

96x DRP SPE'ler ile okumaları gerçekleştirilen yarışmalı ECELISA BKM-7 biyosensörü metodunun çalışma diyagramı Şekil 2.14'de verilmiştir.



4.

- Log/Logit grafiği çiziminde, öncelikle sonuçlardan kör değeri çıkarılmıştır. Ayrıca Bo'ı hesaplamak için NSB değeri Bo'dan çıkarılmış ve standart konsantrasyonlarına karşı Logit B/Bo değerleri kullanılarak, standart grafik Cayman log-logit curve fit EIA analiz programı ile çizilmiştir.

Şekil:2.14. 96x DRP SPE'ler ile okumaları gerçekleştirilen yarışmalı ECELISA BKM-7 biyosensörü metodunun çalışma diyagramı

2.5. Geliştirilen Amperometrik Biyosensör ile Peynir Altı Suyu Örneklerinde BKM-7 Tayini

Çalışmamızda örnek içi BKM-7 tayini, marketlerde satılmakta olan 6 çeşit beyaz peynirin peynir altı suyundan (Torku, Pınar, İçim, Yörsan, Tahsildaroğlu, Süttaş markaları) örnek alınarak yapıldı. Peynir altı suyu BKM-7 miktarları, oluşturulan Log/Logit standart grafiği kullanılarak hesaplandı. Log/Logit grafiği çiziminde, öncelikle sonuçlardan kör değeri çıkarıldı. Ayrıca Bo'ı hesaplamak için NSB değeri Bo'dan çıkarıldı ve standart konsantrasyonlarına karşı Logit B/Bo değerleri kullanılarak, Cayman EIA analiz programı ile log-logit fit standart grafiği çizildi.

2.5.1. Peynir Altı Suyuna Peptit Salınımının Sağlanması

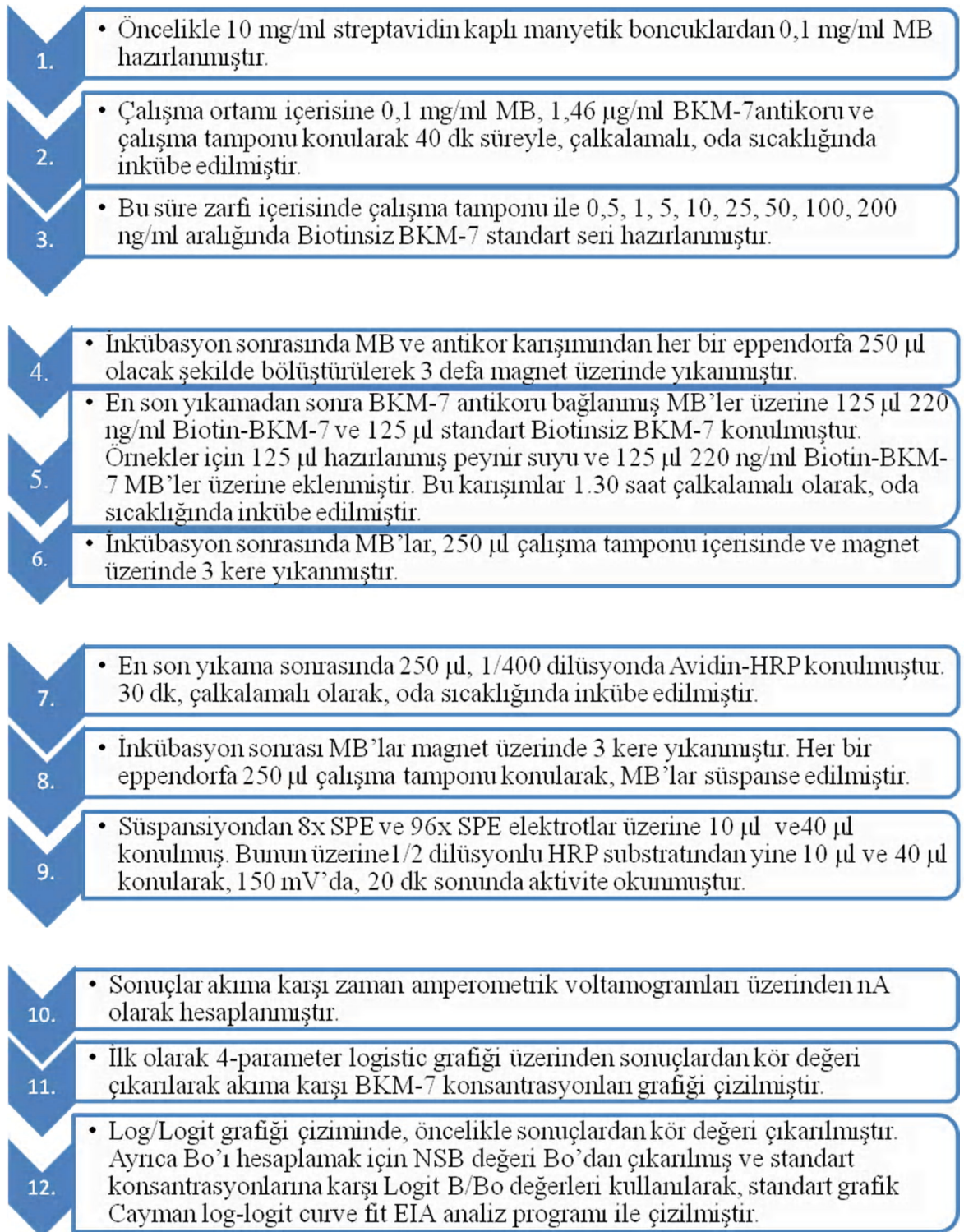
Beyaz peynir örnekleri üretimleri sırasında mayalanma bakterilerinin proteolitik aktivitesi sonucunda, süt β -kazein peptitlerinden peynir β -kazomorfin peptitleri ortaya çıkmaktadır. Bu β -kazomorfin peptitlerini peynir altı suyundan analiz etmek mümkündür. Oda sıcaklığında bir hafta bekletilen ve yeterli proteolitik seviyeye ulaşan her markanın peynir altı suyu sargı bezinden süzülerek peynir tortusu uzaklaştırıldı. Süzüntü örnek olarak kullanıldı.

2.5.2. Peynir Suyundan Peptit Eldesi

Süzülerek elde edilen peynir altı sularının pH'sı 7.4'e ayarlandı. Bu örneklerden 500 μ L alınarak Amicon Ultra-0.5 Santrifügal (MW Cut-off: 3000 Dalton) filtrele konularak 15 dk 14000xg de, 4° de santrifüj edildi. Filtrat örnek çözelti olarak kullanıldı.

2.5.3. ECELISA Yöntemi ile Peynir Altı Suyu Örneklerinden BKM-7 Tayini Prosedürü

8x ve 96x DRP SPE'ler ile okumaları gerçekleştirilen yarışmalı ECELISA BKM-7 örnek konsantrasyonları metot çalışma diyagramı Şekil 2.15'de verilmiştir.



Şekil:2.15. 8x ve 96x DRP SPE'ler ile okumaları gerçekleştirilen yarışmalı ECLISA BKM-7 örnek konsantrasyonları metot çalışma diyagramı

2.6. İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmalar sonucunda uygulanan prosedürün metot içi varyasyon katsayı (%CV) SPSS 15 istatistik programı ile hesaplandı Yapılan çalışmalar sonucunda uygulanan prosedürün metot içi varyasyon katsayısı (%CV) 8xSPE için % 4,7 olarak, 96xSPE için % 8.3 olarak bulundu.

8x ve 96x DRP SPE elektrotlar kullanılarak bulunan 6 farklı peynir altı suyu konsantrasyonları Wilcoxon testiyle incelendi ve iki farklı elektrottan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı sonucuna ulaşıldı (0,524, $p=0,600$). Bu hesaplamalar SPSS 15 istatistik programı ile yapıldı.

3. BÖLÜM

BULGULAR

Tez çalışmamızda Printed-ECELISA cihazına bağlı olarak peynir suyunda opioid aktif BKM-7 peptit tayin metodu geliştirildi. Bu kapsamda elektrokimyasal ölçüm, enzimatik işaretler (HRP) üzerinden yapıldı. Protokol olarak MB ve SPE'ler üzerinden geliştirilen yarışmalı ECELISA metodu kullanıldı.

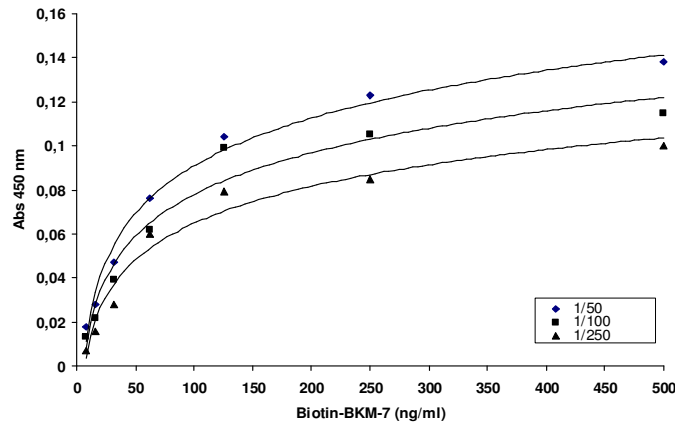
Spektrofotometrik ve ECELISA sistemlerinden BKM-7 konsantrasyonlarına karşı alınan sinyaller, yeni kurulan sistemin özgüllüğü ve deteksiyon limitleri için karşılaştırıldı. Koşullar öncelikle direk immün ölçümlerle belirlendi ve yarışmalı ölçümlere uyarlandı. 8x elektrotlu ekran baskılı karbon elektrokimyasal elektrotlar (8xSPCE) ve 96xSPCE'ler ölçüm sistemi olarak kullanılarak sonuçlar değerlendirildi ve immunosensör tasarımı tamamlandı.

3.1. Spektrofotometrik ELİZA Çalışma Metodu Bulguları

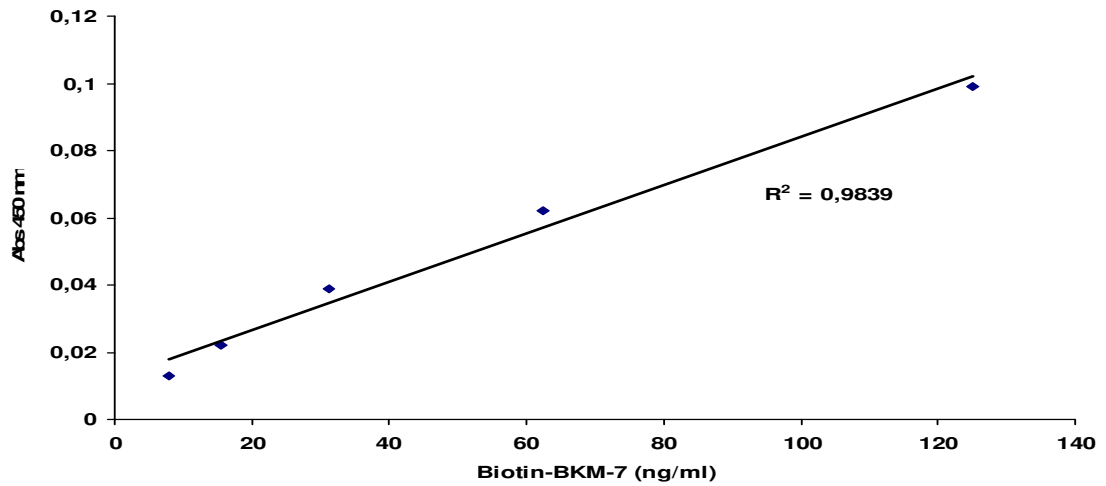
3.1.1. Biotin-BKM-7 Direk ELİZA Sonuçları

Öncelikle spektrofotometrik direk ELİZA ptotokolü optimizasyonu yapıldı ve buna bağlı olarak elde edilen standart grafik için kullanılan antikor ve Avidin-HRP optimum miktarları belirlendi. Bu konsantrasyonlar sırasıyla, 1/100 ve 1/250 dilüsyondur. Elde edilen bu sonuçlar yarışmalı spektrofotometrik ELİSA optimizasyonunda kullanıldı.

Şekil 3.1'de direk ELİSA poliklonal BKM-7 antikor optimizasyon grafikleri verilmektedir. Buradan elde edilen sonuçlarla çizilen BKM-7 Direk ELİSA standart grafiği Şekil 3.2'de verilmektedir. Optimize edilmiş koşullar altında metot ölçüm aralığı 7,8-125 ng/ml BKM-7 olarak bulundu.



Şekil 3.1. Direk ELİSA BKM-7 antikor konsantrasyonları değişim grafiği. BKM-7 konsantrasyonu 7,8-500 ng/ml arasındadır. Avidin-HRP 1/250 dilüsyonda eklenmiştir.



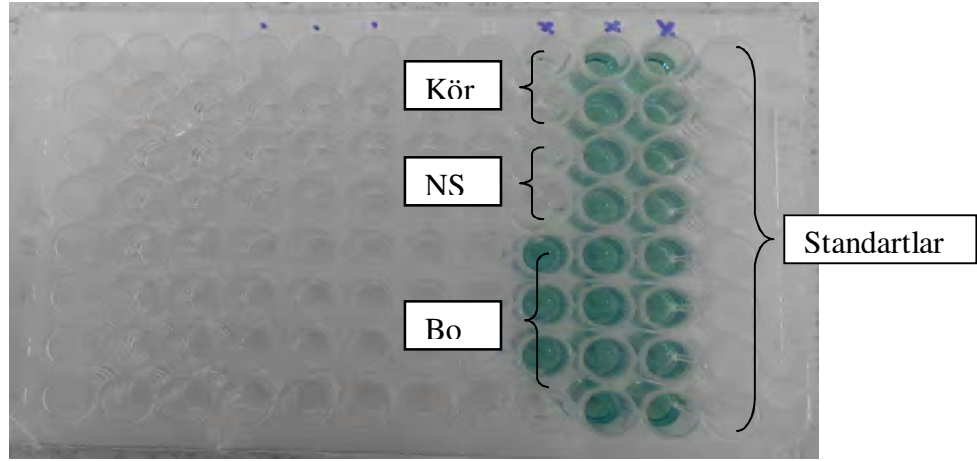
Şekil 3.2. BKM-7 Direk ELİSA standart grafiği: Antikor konsantrasyonu 1/100, ölçüm aralığı 7,8-125 ng/ml'dir.

3.1.2. Yarışmalı BKM-7 ELİZA Sonuçları

Direk BKM-7 ELİZA sonuçları ile elde edilen optimum değerler göz önünde bulundurularak, yarışmalı ELİZA başlangıç çalışmaları yapıldı.

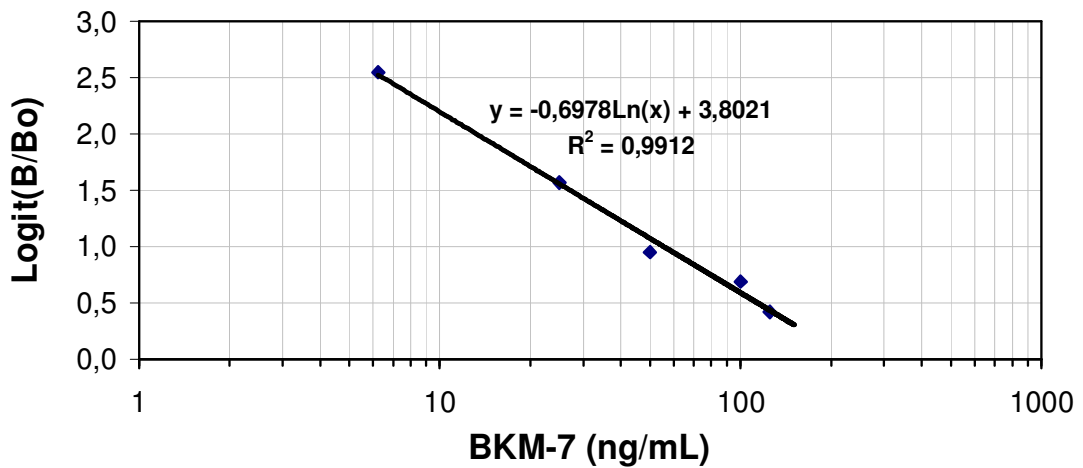
Standart grafiği çizebilmek amaçlı, yine kör, non-spesifik bağlanma (NSB), maksimum bağlanma (Bo) standart seri ile birlikte çalışıldı. Şekil 3.3'de çalışılan ELİZA plakasının çalışma sonrası görünümü verilmektedir. Antikora bağlanmak için biotin bağlı BKM-7 ve biotinsiz BKM-7'nin yarışması yüzünden, renk değişimi direk ELİZA ölçümlerinde

olduğu gibi renk çoğalması şeklinde değil, konsantrasyon arttıkça renk azalması şeklindedir.



Şekil 3.3. Yarışmalı BKM-7 ELİZA'sı plakasının çalışma sonrası görünümü

Şekil 3.4'de BKM-7 yarışmalı ELİSA için log/logit standart grafiği verilmektedir. Grafiklerin çizimi log-logit curve fit, Cayman EIA analiz programı kullanılarak yapıldı. Optimize edilmiş koşullar altında metot ölçüm aralığı 6.25-125 ng/ml BKM-7 olarak bulundu.

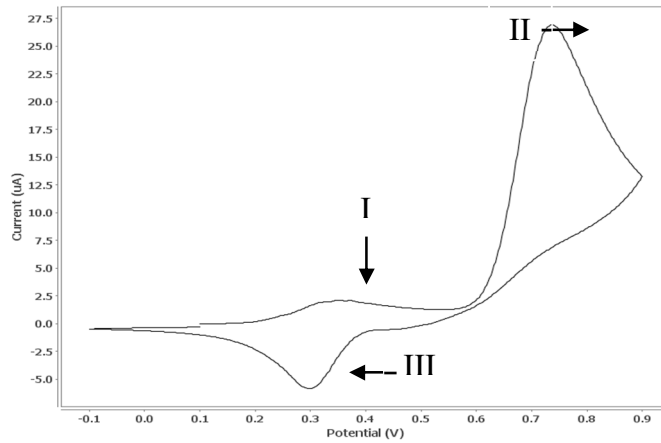


Şekil 3.4. BKM-7 yarışmalı ELİSA için standart log/logit grafiği: ölçüm aralığı 6.25-125 ng/ml BKM-7'dir.

3.2. BKM-7 Elektrokimyasal ELİZA (ECELISA) Ölçüm Metodu Sonuçları

3.2.1. Dönüşümlü Voltametri

Aşağıda verilen dönüşümlü voltametri voltamogramına göre, iki farklı oksidasyon ve bir redüksiyon pik potansiyeli tespit edildi. Potansiyeller sırasıyla, 0.340 (I), 0.738 (II) ve -0.294 (III) mV olarak bulunmuştur (Şekil 3.5). Bu çalışma HRP substratlarının (ABTS ve H_2O_2) karbon elektrotlar yüzeyindeki elektrokimyasal davranışları tayin etmek için yapıldı. Enzimatik reaksiyon sırasında ABTS katyonik ($ABTS/ABTS^{*+}$) ve dikatyonik ($ABTS^{*+}/ABTS^{2+}$) forma okside olmaktadır.

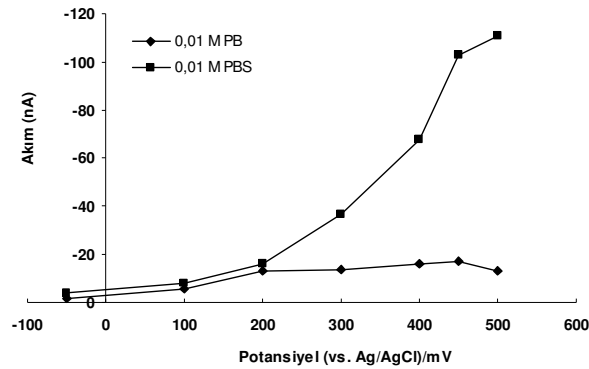


Şekil 3.5. ABTS dönüşümlü voltametri voltamogramı: Voltamogram Ag/AgCl referansa karşı, 50 mVs^{-1} tarama hızıyla çekilmiştir.

3.2.2. Direk ECELISA ile Amperometrik BKM-7 Biyosensör Optimizasyonu

3.2.2.1. Farklı Tampon Denemeleri Sonuçları

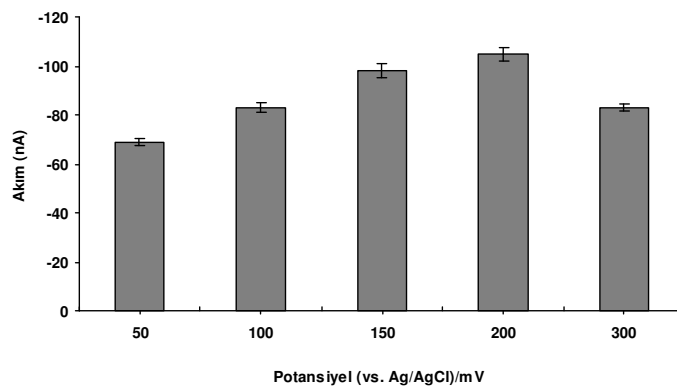
0,01M PBS tamponu (tampon 1), pH 7.4 tamponu ile yine pH'sı 7,4 olan 0,01 M fosforik asit tamponu (tampon 2) karşılaştırılarak alınan amperometrik sinyallere göre tampon 1 çalışma tamponu olarak belirlendi (Şekil 3.6). Tampon 1'de görülen amperometrik değişim, tampon 2'de görülmedi.



Şekil 3.6. Çalışma tamponları karşılaştırma grafiği: -50-500 mV arası tarama yapılmıştır.

3.2.2.2. Uygulama Potansiyeli Sonuçları

MB temelli ECELISA ve Biotin-BKM-7 ile gerçekleştirilen amperometrik ölçümlerde optimum uygulama voltajı, 50, 100, 150, 200 ve 300 mV uygulama potansiyelleri amperometrik sonuçları doğrultusunda değerlendirildi (Şekil 3.7). Çalışılan hidrodinamik voltamogramdan optimum redüksiyon potansiyeli be 150 mV vs. Ag|AgCl olarak seçildi. Çünkü substrat 200mV vs. Ag|AgCl'den sonra okside olmaya başlamaktadır ve bunun akım üzerinde ki etkisinden kaçınılmıştır.

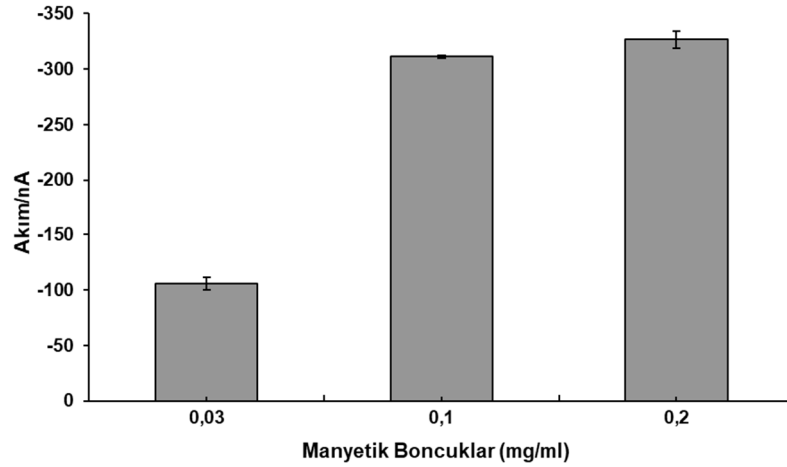


Şekil 3.7. Uygulama potansiyeli voltametri grafiği

3.2.2.3. Streptavidin Kaplı Manyetik Boncuk Konsantrasyonu Optimizasyon Sonuçları

Çalışmada kullanılan streptavidin kaplı MB konsantrasyonunun etkisi farklı miktarlarda (0.03, 0.1, 0.2 mg/ml) MB'ler kullanılarak yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre optimum konsantrasyon 0.1 mg/ml olarak bulundu (Şekil 3.7). Denenen çalışma aralığı

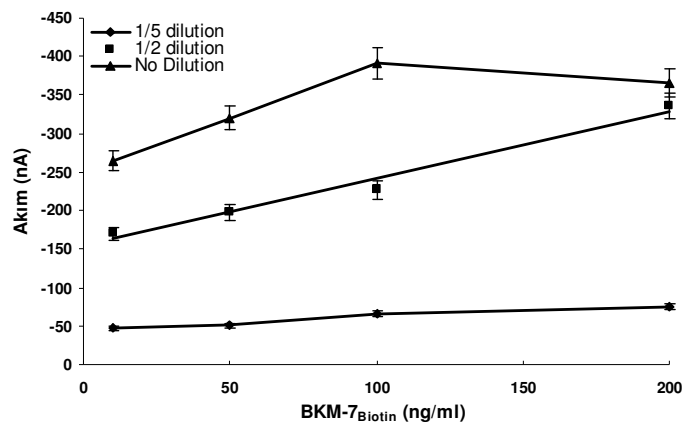
streptavidin kaplı 1 μm çaplı MB'ların biotinli antikor bağlama kapasitesine (20 μg antikor/mg MB) göre belirlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Çalışma koşullarında manyetik boncuk miktarı optimizasyon grafiği

3.2.2.4. HRP Substratı ABTS'in Amperometrik Optimizasyon Sonuçları

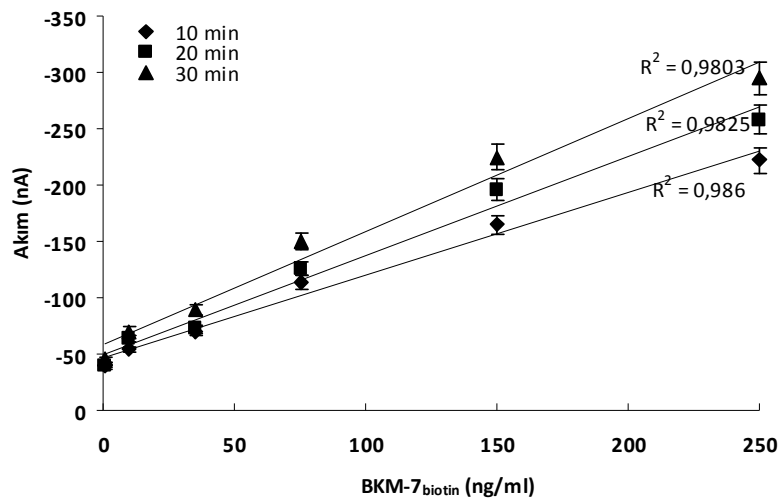
Bu amaçla, HRP substratları ABTS ve H_2O_2 'in farklı konsantrasyonları hazırlanarak, HRP aktivitesi üzerine etkisi MB'lara dayalı biotin-BKM-7 amperometrik sisteminde ölçüldü. Elde edilen akım verilerine göre lineerlik gösteren, 1/2 substrat dilüsyonu sonuçlarıyla elde edilmiş olan doğrusal grafik, optimum değerleri (1,9 mmol/l ABTS ve 0,73 mmol/l H_2O_2) tespit etmekte kullanıldı (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. ABTS ve H_2O_2 optimum konsantrasyonları belirleme grafiği: Biotin-BKM-7 konsantrasyonu 10-200 ng/ml arasındadır. Antikor, MB, Avidin-HRP konsantrasyonları sırasıyla 1,46 $\mu\text{g/ml}$, 0,03 mg/ml ve 1/400 dilüsyondur.

3.2.2.5. HRP Aktivitesi Okuma Süresi Tespiti

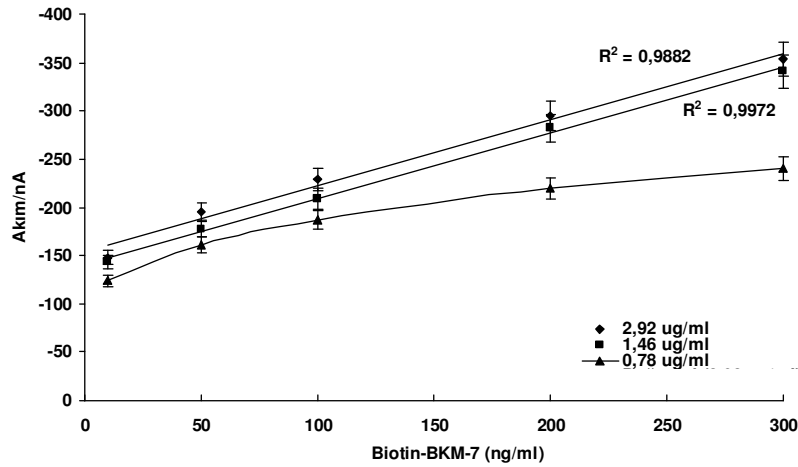
Daha önce optimize edilmiş koşullar altında, HRP'nin substratıyla olan optimum reaksiyon süresi tespiti yapıldı. Her ne kadar süre arttıkça elde edilen akım değişimi artsada ve enzimin ABTS ile verdiği 20 dk okuma süresi optimum okuma süresi olarak kabul edildi. Bunun sebebi 20. dk da elde edilen nA değişim miktarlarının deneysel sonuçlar için yeterli olması ve sürenin uzunluğunun minimum seviyede tutmaktır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. HRP aktivitesi okuma süresi tespiti: Biotin-BKM-7 konsantrasyonları 0,5-250 ng/ml arasındır. Antikor, MB, Avidin-HRP konsantrasyonları sırasıyla 1,46 µg/ml, 0,03 mg/ml, 1/400 dilüsyondur. Substrat konsantrasyonu 1,9 mmol/l ABTS + 0,73 mmol/l H₂O₂'dir. Uygulama potansiyeli 150 mV'dur.

3.2.2.6. Poliklonal BKM-7 Antikor Konsantrasyonu Optimizasyon Sonuçları

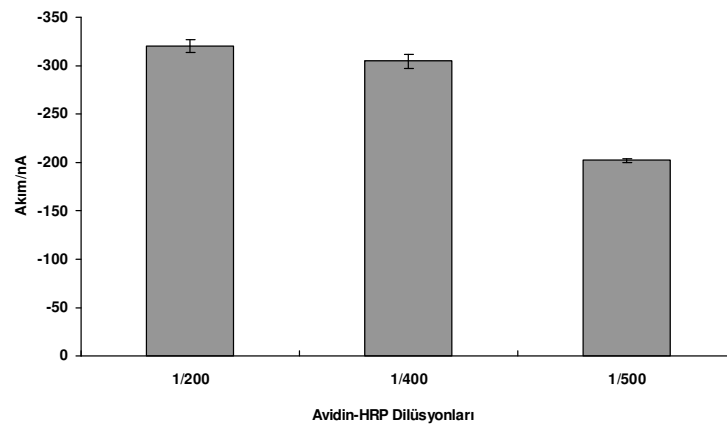
Poliklonal BKM-7 antikor konsantrasyonu çalışması, ECELISA çalışma karışımı içerisindeki etkin antikor miktarını belirlemek amacıyla yapıldı. Denenen çalışma aralığı streptavidin kaplı 1 µm çaplı MB'ların biotinli antikor bağlama kapasitesine (20 µg antikor/mg MB) göre belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre en iyi regresyon eğrisini veren antikor konsantrasyonu, 1,46 µg/ml, optimum miktar olarak kabul edildi. (Şekil 3.11)



Şekil 3.11. Poliklonal BKM-7 antikor konsantrasyonu optimizasyon grafiği: Biotin-BKM-7 konsantrasyonları 10-300 ng/ml arasındır. MB ve Avidin-HRP konsantrasyonları sırasıyla 0,1 mg/ml, 1/400 dilüsyondur.

3.2.2.7. Avidin-HRP Konsantrasyonu Optimizasyon Sonuçları

Avidin-HRP konsantrasyonları optimizasyon çalışmasında 1/200, 1/400 ve 1/500 dilüsyonlar son basamak olarak modifiye MB'ler içeren eppendorflara konuldu. Enzim konsantrasyonunun çalışma ortamı içindeki etkisi daha önce diğer parametreler için elde edilmiş olan optimizasyon koşulları içinde değerlendirildi. 1/400 dilüsyona tabi tutulmuş Avidin-HRP konsantrasyonu, diğer konsantrasyonlara karşı verdiği akım değişimine dayanarak optimum miktar olarak kabul edildi. (Şekil 3.112)



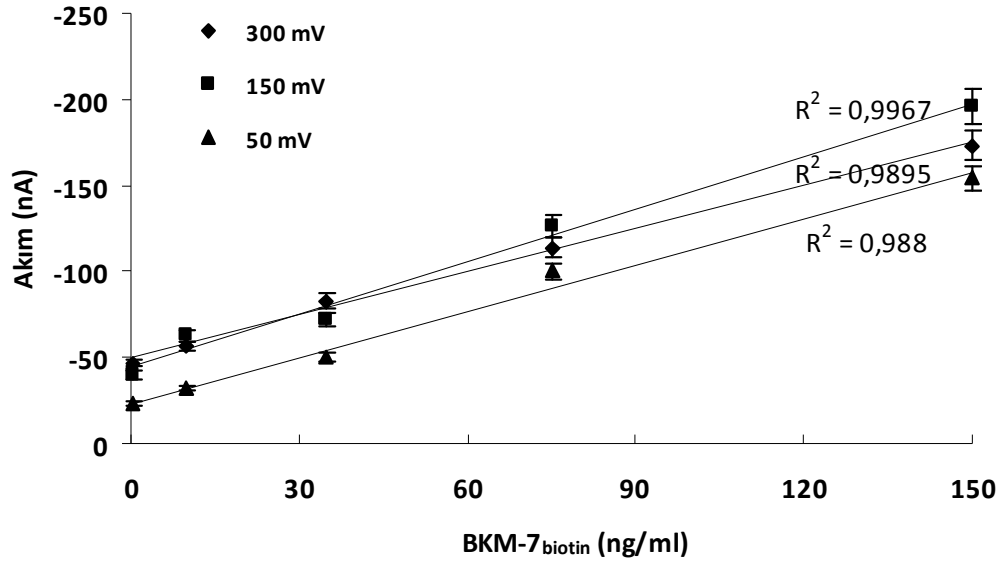
Şekil 3.12. Avidin-HRP konsantrasyonları optimizasyon grafiği: Antikor konsantrasyonu 1,46 ug/ml; Biotin-BKM-7 konsantrasyonu 200 ng/ml'dir. Antikor ve MB konsantrasyonları sırasıyla 1,46 ug/ml, 0,1 mg/ml'dir.

3.2.2.8. Optimizasyonlardan Sonra Standart Grafikler Üzerinden Uygulama Potansiyeli Farkı Sonuçları

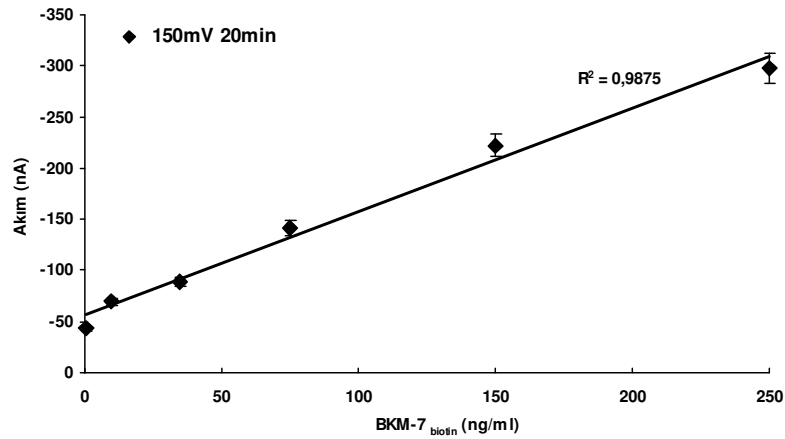
Çalışma ortamında optimize edilmiş olan bütün koşullar altında sistemin tamamının güvenilirliğini göstermek amacıyla tekrardan uygulama potansiyel farkı denendi. Çalışma sonucunda elde edilen standart grafikler doğrultusunda çalışma koşullarımızın optimize edildiği gösterildi (Şekil 3.13). Optimize koşullar altında direk BKM-7 ECELISA immunosensör standart grafiği çizildi (Şekil 3.14). Uygulama optimum voltajının 150 mV olduğu gösterildi. Biotin-BKM-7 ölçüm limitleri 0,5-150 ng/ml olarak bulundu.

Şekil 3.15’de elde edilen biotin-BKM-7 standart grafiğine ait amperometrik voltamogramlar verilmektedir.

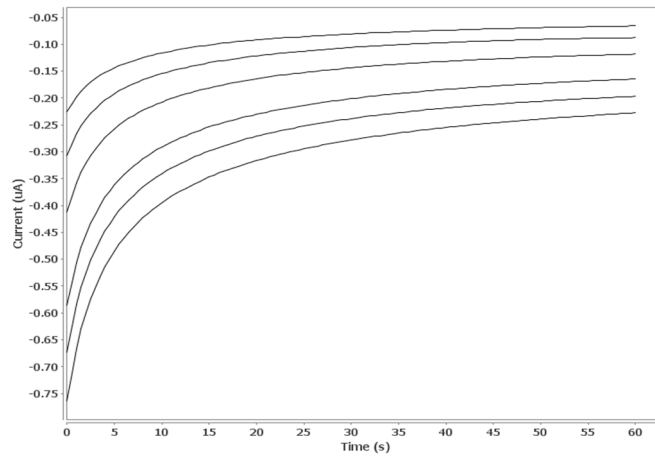
Buraya kadar yapılan optimizasyon çalışmaları 8x DRP SPE elektrotlar ile yapılmıştır. Bu çalışmalarla, yarışmalı ECELISA için gerekli olan çalışma aralıkları ve optimizasyon koşulları belirlenmiş ve ileriki ölçümlerde kullanılmışlardır.



Şekil 3.13. Uygulama potansiyeli farkı çalışma grafiği. Biotin-BKM-7 çalışma aralığı 0,5-150 ng/ml’dir. MB, antikor ve Avidin-HRP konsantrasyonları sırasıyla 0,1 mg/ml, 1,46 µg/ml ve 1/400 dilüsyondur. Substrat konsantrasyonu 1,9 mmol/lit ABTS + 0,73 mmol/lit H₂O₂’dir. Elektrot üzerine 10 µl modifiye MB’lar ve 10 µl substrat konularak 20. dk da okuma yapılmıştır.



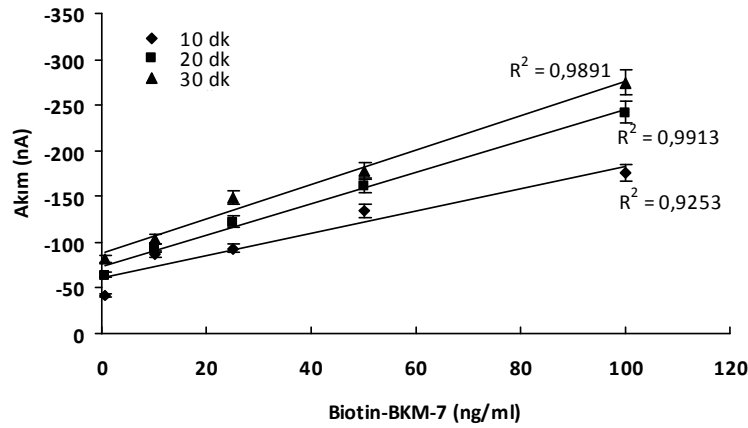
Şekil 3.14. Optimize edilmiş koşullar altında Biotinlenmiş BKM-7 direk ECELISA standart grafiği. Biotin-BKM-7 ölçüm limitleri 0,5-250 ng/ml'dir.



Şekil 3.15. DRP 8X'lik elektrot kullanılarak elde edilen biotin-BKM-7 standart eğrisi amperometrik voltamogram görünümü. Konsantrasyon aralığı 0,5-250 ng/ml'dir.

3.2.2.9. Optimize Edilmiş Koşullar Altında 96x DRP SPE Elektrotlarda Biotin-BKM-7 Direk ECELISA Sonuçları

DRP 8x elektrotlar kullanılarak elde edilen optimum değerler varlığında biotin-BKM-7 direk ECELISA tayini DRP 96x SPE'ler kullanılarak da yapıldı. Bu çalışmada Biotin-BKM-7 konsantrasyon aralığı 0,5-100 ng/ml olarak tutuldu. Grafikler farklı zamanlarda (10, 20 ve 30 dk) okuma yapılarak çizildi. (Şekil 3.16)



Şekil 3.16. Optimizasyon koşullarından sonra 96x Direk Biotin-BKM-7 ECELISA okuma süreleri grafiği. Biotin-BKM-7 konsantrasyon aralığı 0,5-100 ng/ml'dir. Antikor, MB ve Avidin-HRP konsantrasyonları sırasıyla 1,46 µg/ml, 0,1 mg/ml, 1/400 dilüsyondur. Substrat konsantrasyonu 1,9 mmol/l ABTS + 0,73 mmol/l H₂O₂'dir. Elektrot üzerine 40 µl modifiye MB'lar ve 40 µl substrat konularak okuma yapılmıştır. Uygulama potansiyeli 150 mV'dur.

3.3.Yarışmalı BKM-7 ECELİSA Ölçümleri

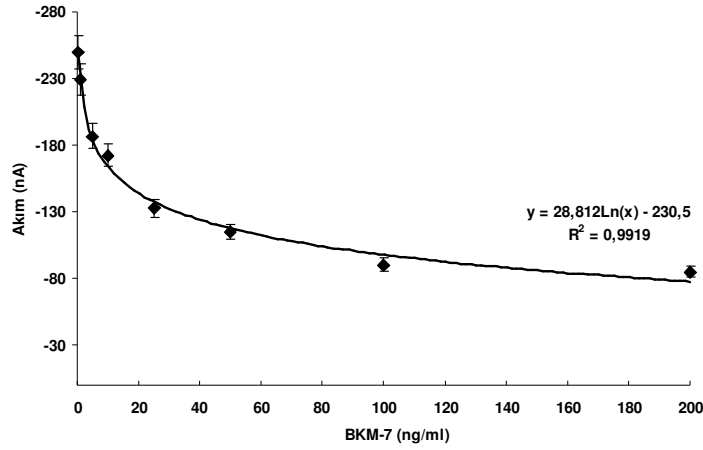
Çalışmanın amacı olan, BKM-7 yarışmalı ECELISA yöntemine dayanan amperometrik biyosensör geliştirme kısmında, direk ECELISA yönteminden elde edilen bulgular kullanılarak, BKM-7 immunosensör metodu tasarlandı. Bu doğrultuda yine avidin-biotin etkileşimine dayalı ECELISA protokolü uygulandı. Bu protokolde, poliklonal BKM-7 antikoruna yarışmalı olarak bağlanan biotin işaretli BKM-7'lere karşı, biotin işaretli BKM-7 konsantrasyonlarına dayalı sinyal eldesi prensibi uygulanarak, ölçümler için hem 8x hem de 96x SPE'ler kullanıldı.

3.3.1. DRP 8x SPE'ler ile Elde Edilen BKM-7 Yarışmalı İmmunosensör Sonuçları

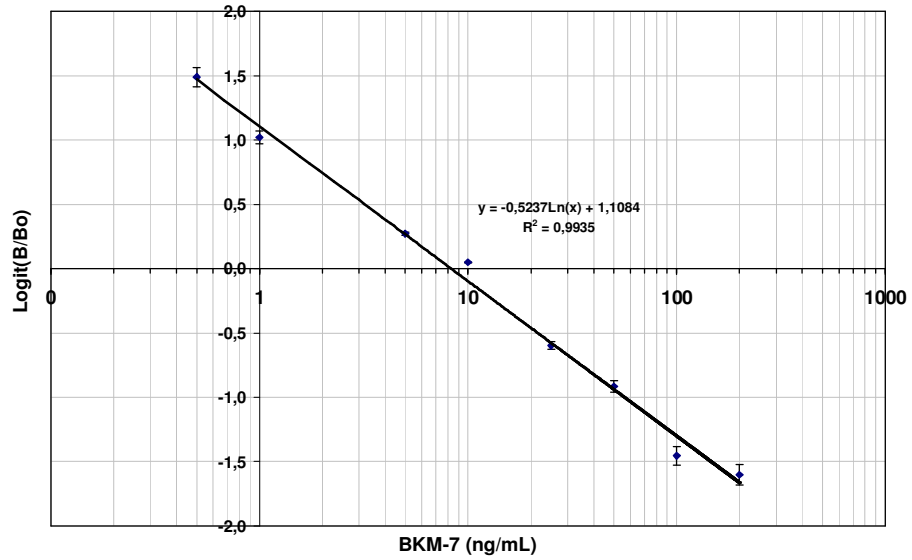
DRP 8xSPE optimizasyon çalışmaları ile elde edilen optimize sonuçlarla, yarışmalı ECELISA deneyleri gerçekleştirildi. Elde edilen akım değişimleri kullanılarak öncelikle 4-parameter logistic grafiği üzerinden akıma karşı BKM-7 konsantrasyonları grafiği çizildi (Şekil 3.17).

Log/Logit grafiği çiziminde, öncelikle sonuçlardan kör değeri çıkarıldı. Ayrıca Bo'ı hesaplamak için NSB değeri Bo'dan çıkarıldı. BKM-7 yarışmalı ECELISA standart

grafiği, standart konsantrasyonlarına karşı Logit B/Bo değerleri kullanılarak, Cayman log-logit curve fit EIA analiz programı ile çizildi (Şekil 3.18). Log/logit grafiği, 4-parameter logistic grafiğini lineer hale getirmek ve örnek sonuçlarını bu grafikten hesaplamak için çizildi.



Şekil 3.17. DRP 8x elektrotta BKM-7 tayini için tasarlanan edilen manyetik boncuk temelli yarışmalı ECELISA metodu için elde edilen akıma karşı konsantrasyon 4-parameter logistic grafiği. BKM-7 konsantrasyon aralığı 0,5 – 200 ng/ml’dir.

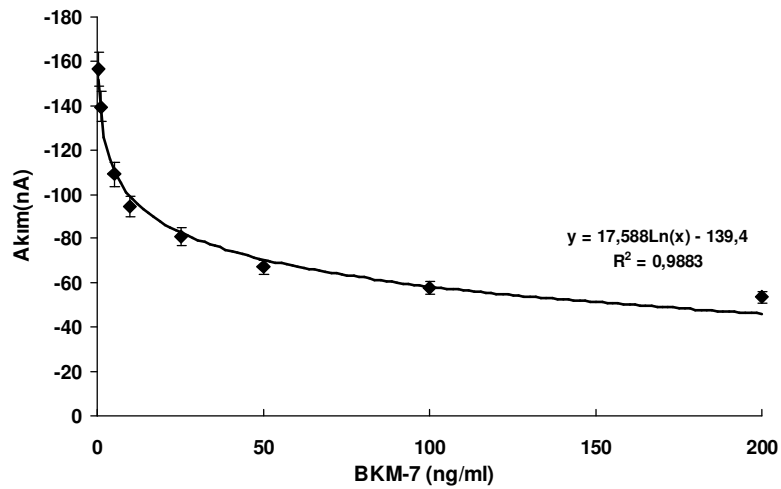


Şekil 3.18. DRP 8x’lik elektrotta BKM-7 tayini için tasarlanan edilen manyetik boncuk temelli yarışmalı ECELISA metodu için elde edilen log/logit grafiği. BKM-7 konsantrasyon aralığı 0,5 – 200 ng/ml’dir.

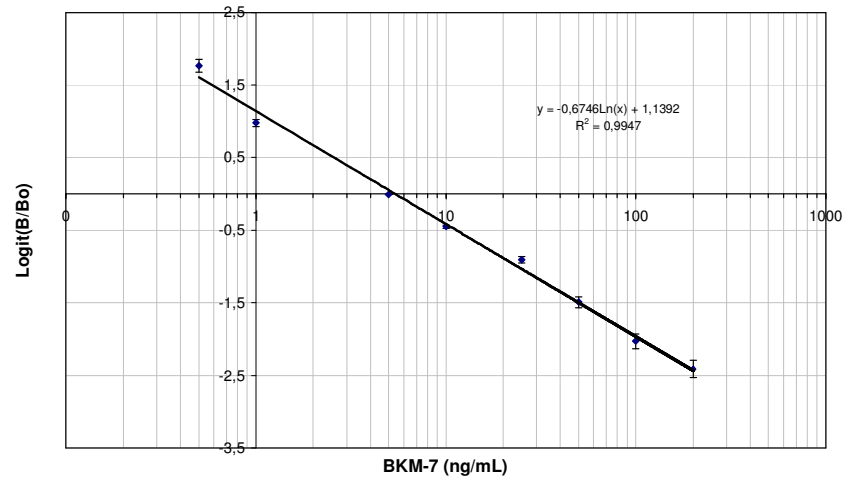
3.3.2. 96x SPE Dropsens Elektrotlar Kullanılarak Çalışılan Yarışmalı BKM-7 Biyosensör Sonuçları

DRP 8xSPE optimizasyon çalışmaları ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda, DRP 96xSPE yarışmalı ECELISA deneyleri gerçekleştirildi. Elde edilen akım değişimleri kullanılarak öncelikle 4-parameter logistic grafiği üzerinden akıma karşı BKM-7 konsantrasyonları grafiği çizildi (Şekil 3.19).

Log/Logit grafiği çiziminde, öncelikle sonuçlardan kör değeri çıkarıldı. Ayrıca Bo'ı hesaplamak için NSB değeri Bo'dan çıkarıldı. BKM-7 yarışmalı ECELISA standart grafiği, standart konsantrasyonlarına karşı Logit B/Bo değerleri kullanılarak, Cayman log-logit curve fit EIA analiz programı ile çizilmiştir (Şekil 3.20). Log/logit grafiği, 4-parameter logistic grafiğini lineer hale getirmek ve örnek sonuçlarını bu grafikten hesaplamak için çizildi.



Şekil 3.19. 96x SPE Dropsens elektrotta BKM-7 tayini için dizayn edilen manyetik boncuk temelli yarışmalı ECELISA metodu için elde edilen akıma karşı konsantrasyon grafiği. BKM-7 konsantrasyon aralığı 0,5 – 200 ng/ml'dir.



Şekil 3.20. 96x Dropsens SPE elektrotta BKM-7 tayini için dizayn edilen manyetik boncuk temelli yarışmalı ECELISA metodu için elde edilen log/logit grafiği. BKM-7 konsantrasyon aralığı 0,5 – 200 ng/ml’dir.

3.4. Peynir Altı Suyu BKM-7 Yarışmalı ECELISA Metodu Optimizasyonu:

Çalışma standart koşullar altında, metotta belirtilen örnek hazırlama prosedürünün devamında yapılmıştır. Her iki mütipleks elektrotta kullanıldı.

Yapılan çalışmalar sonucunda uygulanan prosedürün metot içi varyasyon katsayısı (%CV) 8xSPE için % 4,7 olarak, 96xSPE için % 8.3 olarak belirlendi.

Tablo 3.1’de 6 adet farklı marka peynir sularında tespit edilen BKM-7 miktarları verilmektedir. Sonuçlar çift tekrarlı verilerden elde edildi. Sonuçların istatistiksel analizi Wilcoxon testiyle incelenmiş olup ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı sonucuna ulaşıldı ($Z=-0,524$, $p=0,600$).

Tablo 3.1. 8X ve 96X LİK Elektrotlarda 6 farklı peynir altı suyuna ait BKM-7 konsantrasyon sonuçları ($Z=-0,524$, $p=0,600$)

6 Farklı Marka Beyaz Peynir Altı Suyu	96x DRP SPE'den Elde Edilen Sonuçlar (BKM-7 ng/ml)	8x DRP SPE'den Elde Edilen Sonuçlar (BKM-7 ng/ml)
[1]	227,03±5,9	190,67±1,14
[2]	0,77±0,008	0,23±0,006
[3]	122,25±1,96	119,7±0,67
[4]	173,48±2,78	199,05±1,11
[5]	88,63±2,84	64,85±0,18
[6]	33,98±1,26	36,6±0,21

Genel deneysel sonuçlar olarak aşağıdaki veriler bulunmuştur.

1. 0,01M PBS pH 7.4 tamponu, pH'sı 7,4 olan 0,01 M fosfat tamponu ile karşılaştırılarak çalışma tamponu olarak belirlendi.
2. Enzim (HRP) substratları, ABTS ve H₂O₂, optimum konsantrasyonları sırasıyla, 0.73 µmol/ml ve 1.9 µmol/ml olarak bulundu. Bu koşullar da hem doğrusallık hem de eğim açısından uygun akım değerlerine ulaşıldı.
3. Uygulama potansiyeli olarak 150 mV vs. Ag/AgCl belirlendi.
4. 10, 20 ve 30. dakikalarda ABTS'e karşı HRP aktivitesi alınarak, okuma süresi 20 dk olarak belirlendi.
5. Biotinlenmiş BKM-7 direk ECELISA standart grafiği çizilerek, çalışma aralığı 0.5-250 ng/ml olarak belirlendi.
6. BKM-7 tayini için dizayn edilen manyetik boncuk temelli yarışmalı ECELISA metodu için elde edilen akıma karşı konsantrasyon ve log/logit grafikleri çizilerek, çalışma ölçüm aralığı 0.5-200 ng/ml olarak bulundu.

4.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma

Belirli sağlık faydaları aktarmak üzere özel maddeler ile güçlendirilmiş gıdaları tanımlamak için, sanayi tarafından 1980'lerde Japonya kökenli terim "fonksiyonel gıda" terimi kullanılmıştır. Etkili diyet müdahale ve stratejileri ararken, gıdanın yeni bir sınıfı “fonksiyonel gıda” hızla gelişmiş ve bu probiyotik, prebiyotik, nutrasötik gibi birçok yeni terimleri ortaya çıkarmıştır. Fonksiyonel gıda için birçok olası tanımlar vardır; ancak, fonksiyonel gıda genellikle temel beslenme sağlanması ötesinde sağlık teşviki gıda olarak tanımlanmaktadır. Fonksiyonel gıdalar, doğal gıdalardan meydana gelen ve sadece içeriği zenginleştirilmiş olabilirler. Benzer olarak, pozitif bir şekilde vücut işlevlerinin sınırlı sayıda etkileyen bir yiyecek bileşeni içeriyorsa, bir fonksiyonel gıda olduğunu belirtilmiştir. Ancak, Pariza (1999) fonksiyonel gıda için yeni bir tanım önermiştir. Bu da "imal" sürecinde bir genetik mühendisliğin yanı sıra geleneksel gıda işleme uygulamaları yoluyla değişmesiyle insan müdahalesi bir ürünü ifade etmektedir [65].

İnek sütünün ekosistemde en değerli doğal besinlerden birisidir. Bu sebepten, ekonomik kaygılarla çiftlik hayvanlarının ekonomik önem taşıyan vasıflarını ön plana çıkarmak için genetik iyileştirmeyi amaçlayan ıslah çalışmaları uygulanmaktadır. Bu asrın başlarında akademik olarak çalışılmaya başlanan süt protein tipleri damızlık seçiminde ölçüt olarak alınmaya ve genetik popülasyonların ıslahında kullanılmaya başlanmıştır [111]. Fakat bu ıslah çalışmaları ve gen modifikasyonları normalde sütlerde bulunmayan zararlı proteinlerin açığa çıkmasına sebep olmuştur [112].

Dünyada şu an A1 ve A2 tip kazein içeren süt olarak nitelendirilen sütler arasında önemli farklar bulunmaktadır. Bu fark, A1 sütü yani geni oynanmış ineklerden elde edilen (daha çok süt elde etmek amaçlı olan özellikle Hollanda inekleri-Holstein, Jersey

gibi) meydana getirmekte, A2 ise beta-kazein üzerinde mutasyona uğramamış olan ineklerden elde edilen sütü simgelemektedir.

Türkiye, Kuzey Anadolu yerli ırkları bu farklılaşmaya uğramış geni ve buna bağlı olarak mutajenik kazeini taşımamaktadır. Yani sağlıklı süt sağlamaktadırlar [113]. Araştırmacılar farklı ülkelerindeki inek sütü tipleri hakkında araştırma yaparak BKM-7 insidansı hakkında bilgi vermişlerdir.

Mohammad Raies Ul Haq ve ark. (2015) hint sığırlarının beta-kazein varyantlarının sindirimi sırasında salınmış gastrointestinal BKM-7'nin salınımı konusunda araştırma yapmışlardır. Hindistan da ki en iyi süt vericiler arasında ki melez Karan Fries (KF) ineklerinin, A1 ve A2 allelleri taşıyıcıları olduğu göstermişlerdir. MS-MS ve yarışmalı ELİZA yöntemiyle genlerdeki BKM-7 fraksiyonlarını belirlemişlerdir. A1A1 varyantının A1A2 varyantına göre yaklaşık 3.2 kat fazla olduğu gözlemlemişlerdir [114].

Asledootir ve ark. (2017) ex vivo gastrointestinal sindirimden sonra A1 ve A2 sığır beta-kazeinden BKM-7 biyoaktif peptidinin tanımlanması ve nicelendirilmesi üzerine araştırma yapmışlardır. Bu çalışma, beta-kazeininin farklı genetik varyantlarını göstermektedir. Kütle spektrometri analizleri, 60YPFPGPIP68 peptidinin sadece prolin içeren varyantlardan tespit edildiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, beta-kazein genetik varyasyonunun in vitro sindirim ile ilgili yayımlanmış literatür tarafından daha önce verildiği üzere yalnızca A1 varyantıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir [115].

Beta-kazomorfin araştırmalarının bu kadar önemli olmasının sebebi, bu opioid aktif peptitlerin insan sağlığı üzerine olan etkileridir. Opioid peptitler, opioid agonist (rahatlatıcılar) ve opioid antagonist (uyarıcılar)'dan oluşmaktadır. Rahatlatıcı etkiye sahip peptitler morfin benzeri uyuşturucu bir etki gösterirken, uyarıcı peptitler ise bu etkiyi azaltıcı ya da engelleyici bir etki gösterir. Kazein kaynaklı peptitlerden kazokinler uyarıcı etkiye, eksorfin, α ve β -kazomorfin ise rahatlatıcı etkiye sahiptirler β -kazomorfinler, β -kazeinlerden türeyen 3'ten 7 aminoasite kadar değişen küçük peptitlerdir [116]. BKM'ler sindirim esnasında ya da besin işlenmesi sırasında β -kazeinden serbest bırakılırlar. 60 ile 66 rezidüde yer alan Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile sekanslı peptit ilk kez 1970'lerin sonunda kazein-türevli opioid peptit olarak tanımlanan

büyükbaş β -kazomorfin-7 (BKM-7)'dir [113, 114]. BKM-7 opioid peptiti besin proteinlerinden türeyen biyoaktif peptitin ilk örneğidir ve mü-opioid reseptör ligantıdır. BKM-7'nin N-terminalindeki "Tyr-Pro-Phe" dizilimi, peptidin reseptörlere bağlanmasını sağlamaktadır. Bu sayede opioid özelliklere sahip olan peptit vücutta morfin-benzeri aktivite gösteren bir molekül olarak hareket edebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı, bu molekülün farklı hastalıkların sebebi olduğu literatürde verilmiştir [117]. Biyoaktif peptitlerin insan sağlığında ve beslenmesindeki önemi sürekli vurgulanmıştır [33].

Beta-kazomorfin tüketiminin birçok hastalığa sebebiyet verdiği ve risk faktörü olduğu çok çeşitli çalışmalarda yıllar boyunca ifade edilmiştir [118]. Bu amaçla, sütte ve süt ürünlerinde opioid aktif peptidlerin varlığı ve miktar analizleri, süt kalitesi parametreleri ölçümleri arasına katılmıştır [119].

Bugüne kadar yapılan çalışmalardan yola çıkarak, tip 1 diyabet gelişiminde rolü olan BKM-7'nin, Swinburn (2004) ve Truswell' in (2006) sağlık sorunları raporları sonucuna dayanarak besinlerde bulunmasına izin verilmemiştir (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi Bilimsel Raporu, 2009) [119]

Dünya üzerinde büyük öneme sahip olan A1 ve A2 tip süt ayrımı için çeşitli çalışmalar yıllardır süregelmektedir. Bunun için öncelikle hayvanların genotiplemesi ve süt ve süt ürünleri kazeinlerinin protein özellikleri çalışılmıştır [120].

1990'ların sonunda, bazı raporlar kazein varyantı A1 tüketiminin bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur. İnsanlarda diyabet (insüline bağımlı) ve iskemik kalp hastalığı kazein A1 varyantı tüketimi sonucu arttığı literatürde verilmiştir [121]. Bu beta-kazein varyantı bazı insan hastalıklarının gelişiminde belli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, ani bebek ölümü sendromu (SIDS)'inde varyant beta-kazomorfin ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [122].

McLachian'ın 2001 yılında yaptığı çalışmaya göre, günlük 2-4 mg A1 tip β -kazein alınınının iskemik kalp hastalıklarına ve diğer β -kazein A1 tüketimine bağlı hastalıkların risk faktörlerinde önemli bir artışına sebep olduğu anlaşılmıştır. 0.5-1.5 mg A1 β -kazein tüketen toplumlarda risk faktörlerinde önemli artış gözlenmemiştir [123].

Jarmolowska ve ark. (1999), opioid aktiviteyi ticari Brie, Kaszkawal, Kamp ve Tilsit peynirleri kullanarak test etmişlerdir. Bu peynirlerin peptid özlerinin, izole tavşan bağırsağın da artan kasılmalara sebep olduğu ve yoğun opioid aktivitesini görüntülemişlerdir. Opioid aktivitesini izole tavşan bağırsak motor aktivitesi üzerinde morfin ve peynir özüne karşı eylemleri karşılaştırarak tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlarla, yazarlar hem morfin hem de peynirin peptit özünün opioid reseptörleri ile etkileşimi ve bağırsak kasılmaları ile genliğinin arttığını göstermişlerdir [124].

Kaminski ve ark. (2007), sığır β -kazein polimorfizmi ve potansiyelinin insan sağlığına olan etkisini araştırmışlar. Bu çalışmada boğalarda beta-kazein alellerinin sıklığını genetik olarak incelenmiş. İstemik kalp rahatsızlığı, tip 1 diyabet ve ani bebek ölümü sendromlu kişilerin diyetlerinde daha çok β -kazein türevlerine rastlanmıştır [125].

De Noni ve ark. (2009) beta-kazomorfinlerin potansiyel sağlık etkilerinin gözden geçirilmesi ile ilgili araştırmalar yapmışlardır. Bu çalışmada, peptitlerin rahatlıkla kan beyin bariyerinden geçebildiği, otizm ve diğer birçok kardiyovasküler hastalıklara , insülün bağlı tip 1 diyabete neden olduğu yönünde ilişki kurulabilir olduğu söylenmiş ama net bir sonuca ulaşamamıştır [126].

Banks (2015), opioid peptidler ve kan-beyin bariyeri üzerinde araştırma yapmışlardır. Peptidlerin ve düzenleyici proteinlerin kan-beyin bariyeri (BBB)'ni geçebileceğini gösterilmişlerdir. Yaptığı çalışmalar, BBB'yi geçerken peptitlerin ve düzenleyici proteinlerin beyine bilgi verici moleküller olarak etkili olduğu gösterilmiştir. Bu şekilde peptitler ve proteinlerin gelişimsel ve fizyolojik değişikliklere sebep olduğunu belirlenmiştir [127].

Sokolov ve ark. (2014), inek BKM-7 immünreaktivite düzeylerinin, otistik çocukların idrarlarında yüksek miktarda olduğunu göstermişlerdir. Süt kazeininden gelen eksojen opioid peptitlerin yüksek konsantrasyonlarının çocuklarda otizmin patojenezine katkıda bulabileceğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar yeni bir yüksek duyarlılıklı ELİZA metodu kullanarak, otistik çocukların idrarında kontrol çocuklarına oranla çok daha fazla idrar BKM-7 seviyesine sahip olduklarını göstermişlerdir. Otistik belirtilerin

çokluğunun idrarda BKM-7 konsantrasyonları ile korele olduğunu göstermişleridir [128].

Lister ve ark. (2015), kemirgenlerde gıda kaynaklı opioid benzeri peptitlerin davranışsal etkilerini şizofreni için incelemişlerdir. Bunun için buğday gluteni ve süt kazein türevi gibi diyet peptitlerinin aşırı yüklenmesini uygulamışlardır. Çalışmada çeşitli gıda türevi opioid benzeri peptidlerin etkilerini incelemek için çeşitli davranış testleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, gıda kaynaklı peptitlerin kemirgen davranışını etkileyebildiğini göstermişlerdir [129].

Kazomorfinlerin zararlı etkilerinin yanı sıra, son zamanlarda yararlı etkilerinin de olabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmektedir. Bu doğrultuda daha önce zararlı etkileri olduğu söylenen hastalıklar üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Wei Zhang ve ark. (2012), BKM-7'nin tip 1 diyabet üzerindeki varsayımsal koruyucu etkisini bir sıçan modelinde araştırmışlardır. Sıçanları kontrol, diyabet ve β - kasomorfin-7-tedavi grubu olarak üç gruba ayırmışlardır. Biyokimyasal kan şekeri ve böbrek fonksiyonu da dahil olmak üzere çeşitli parametreler incelemiş ve TGF-1 plazma konsantrasyonunu ELİZA ile ölçmüşlerdir. Bulgularında, BKM-7'nin, diyabetin neden olan böbrek interstisyel fibrozunu zayıflatır yönde etki ettiği verilmektedir [130].

Dong-Ning Hana ve ark. (2013), streptozotosin kaynaklı hiperglisemi ve oksidatif stres uygulanan diyabetik sıçanlarda BKM-7'nin kardiyomiyopati üzerine koruyucu etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak BKM-7'nin miyokardiyal enerji metabolizmasını iyileştirdiğini, kanda ve kasta serbest radikal aracılı oksidatif stresi azalttığı sonucuna ulaşmışlardır [131].

Jarmołowska ve ark. (2013), glikoz ve kalsiyum iyonlarının, Caco-2 hücrelerinin bir monolayerinden BKM-7 geçirgenliğinin verimliliğine etki edip edemeyeceğini araştırmışlardır. ELİZA yöntemini uygulayarak BKM-7'nin Caco-2 monolayer üzerinden geçirgenlik katsayısı hesaplamışlardır. Kültür ortamında glikoz ve Ca^{2+} konsantrasyonlarında bir artışla BKM-7 geçiş verimliliğinde bir artışın olduğu sonucuna

ulaşmışlar ve bu sonuçların bebeklerdeki iltihaplanma ve gıda alerjisinin patojenezinin anlaşılmasında faydalı olacağı yönünde görüş belirtmişlerdir [132].

Etkileri bu kadar fazla olan BKM-7'nin farklı örneklerde gösterimi ve değerlendirilmesi elzem hale gelmiş bulunmaktadır. Süt ve süt ürünlerinde (süt, yoğurt, peynir gibi) BKM-7 tespitinde birçok farklı yöntem geliştirilmiş ve literatüre sunulmuştur. Açığa çıkan biyoaktif peptitlerin analizleri çeşitli analitik yöntemlerle tespit edilmektedir [133]. BKM-7 tayininde, sütün in vitro enzimatik sindirim sonucu açığa çıkan peptitleri göstermek amacıyla spektral karşılaştırma, second order derivative spectroscopy ve HPLC yöntemleri ilk yıllarda kullanılan metotlardır [134]. Bu metotlar ile BKM-7 miktar ölçümü yapılamamaktadır. Az sayıda BKM-7 ölçüm metodu yayınlanmıştır.

Edmund ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada iyi tanımlanmış β -kazeinin kullanımını araştırmışlardır. Ekstraselüler proteazın oluşturduğu peptitleri sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC/MS) ile tanımlamışlardır [135].

Macaud ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada mide proteinazı ile müdahaleden sonra kazeinden izole edilebilen yeni kazomorfin-benzeri peptidi göstermişlerdir. İnek sütü kazein peptit hidrolizatından kazomorfin ve kazomorfin-benzeri peptitin tespiti için hızlı bir metot uygulamışlardır. β -kazomorfin 1-3 ve α 90-94 kazomorfin-benzeri peptitleri ters-faz HPLC ile tespit etmişlerdir. Bu tekniğin kompleks hidrolizatlardan aromatik aminoasitleri içeren biyoaktif peptitlerin tanımlanması ve saflaştırılmasını basitleştirdiğini göstermişlerdir [136]

Jarmolowska ve ark. (2007) yeni doğmuş bebekler için üretilen ticari bir bebek mamasını agonistik dört opioid peptide karşı test etmiş ve β -kazomorfinlerin oluştuğunu gözlemişlerdir. Bu çalışmada izole tavşan bağırsağı motor aktivite üzerindeki etkileri inceleyerek, peptit varlığını HPLC ile belirlemişlerdir. Sonuç olarak, bu formüllerin opioid aktivite çeşitliliğinin ek bir göstergesi olabileceğini öne sürmüşlerdir [137].

Ekstra keskin Cheddar, İsviçre, Blue, Brie ve Limburger peynirlerinin analizleri Muehlenkamp ve Warthesen (1995) tarafından literatüre sunulmuştur. Bu yazarlar tarafından yapılan çalışmalarda, BKM-7 peynirlerde saptanamamıştır. Fakat nihai sonuç olarak yazarlar, daha hassas algılama yöntemleri ile peynirde muhtemel BKM-7 varlığının gösterilebileceğini ön görmüşlerdir.

Senocq ve ark., 2002 yılında comte peynirinin çeşitli starter kültürleri ile olgunlaştırma süreci sırasında, β -kazeinin ile sindirimi ile açığa çıkan peptit fragmantlarını indirek ELİZA metodu ile araştırmışlardır ve farklı fragmantları % içerik olarak sunmuşlardır [138].

Garcia ve ark (2009), nano elektrosprey, iyon tutucu kütle spektrometrisi ile süt ürünlerinde beta-kazomorfinler ve türevleri üzerinde araştırma yapmışlardır. Elektron spreyi (ESI) quadrupole iyon tuzak kütle spektrometresi ile (QIT-MS) peynir ve sütte bu bileşikleri incelemişlerdir. Çikolatalı süt veya peynir örnekleri kullanılarak beta- kazomorfinler için kalibrasyon verileri elde etmişlerdir: NanoMate / MS (25-1000 g / L); NanoMate / MS2 (5-1000 g / L); NanoMate / MS3 (2.5-1000 g / L) [139]. Burada ölçüm limiti mg/ml'dir.

Yoğurt ve peynirde yapılan diğer çalışmalardan biri olan Juan-Garcia ve ark.'nın (2009) çalışması süt ürünlerinden beta-kazomorfinlerin tespiti için nanoelektrosprey ile birlikte ion-trap-mass spektrometresi metodunu geliştirilmesi ve kazomorfinlerin süt ve süt ürünlerinden direkt ölçümünün sağlanmaya çalışmasıdır [140].

Sienkiewicz-Szlapka ve ark. (2009a), farklı peynir türlerinde agonistik ve antagonistik opioid peptit içeriğini araştırmışlardır. Agonistik (β -casomorfin-5 ve β -casomorfin-7) ve antagonistik olan üç opioid peptid (kazoksin-6, kazoksin-C ve laktoferroksin A) etkinliği, üç yarı sert peynirde (Edamski, Gouda ve Kasztelan) ve iki olgunlaşma kalıp peynirinde (Brie ve Rokpol) incelenmiştir. BKM'lerin kalıp peynirlerinde daha yüksek seviyede bulunurken, antagonistik olan opioid peptidlerin miktarının yarı sert peynirlerde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Peptitlerin opioid aktivitelerini izole tavşan deneyleri ile teyit etmişlerdir[141]. Geliştirilen Rekabetçi ELİZA, EC_{50} 'de tahmin edilen hassasiyeti göstermiştir BKM konsantrasyonu kalıp peynirlerinde daha yüksek seviyede bulunurken, antagonistik olan opioid peptidlerin miktarının yarı sert peynirlerde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Kalıp yarı sert peynirlerdeki BKM'lerin miktarı $166-648 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ olarak bulmuşlardır

Sienkiewicz-Szlapka ve ark. (2009b), Brie, Rokpol, Edamski, Gouda ve Kasztelan çeşitli peynir ekstraktlarında BKM-5 ve BKM-7 miktar tayinini yarışmalı ELİZA testi ile gerçekleştirmişlerdir. Peynir ekstraktlarından saflaştırdıkları BKM-7'nin miktarını peynir çeşitlerine göre Brie için 648 ± 79 , Rokpol için 166 ± 20 , Edamski için 100 ± 12 ,

Gouda için 6 ± 1 ve Kasztelan için $4 \pm 0.3 \mu\text{g}.100.\text{g}^{-1}$ (w/w) olarak bulmuşlardır. BKM-7 için ELİZA testi hassasiyetini $13 \pm 2 \text{ pg/ml}$ olarak vermişlerdir [141]. Bu ölçüm limiti bizim limitimizden daha hassastır. Bu farklılık BKM-7'ye karşı üretilen monoklonal antikor özelliğinden kaynaklanmaktadır.

De Noni ve ark. (2010) çeşitli peynir ekstraktlarından elde ettikleri suda çözünebilir peptit fragmentlerinin HPLC-MS/MS analizleri ile BKM-7 miktarlarını Brie'de 0.15 ± 0.02 , Fontina'da 0.04 ± 0.01 , Gouda'da 0.1 ± 0.02 , Gorgonzola'da 0.01 ve Cheddar'da $0.11 \pm 0.02 \text{ mg.kg}^{-1}$ (w/w) olarak bulmuşlardır [142].

Kost ve ark. (2009), insan ve inek sütüyle beslenen infantların plazmalarındaki insan ve inek BKM-7 miktarlarını, fizikomotor gelişim açısından, RIA (ölçüm hassasiyeti fmol/ml) ile tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, inek sütü ile beslenen ve serum BKM-7 miktarları yüksek çıkan infantların fizikomotor davranışlarının, anne sütü ile beslenenlere göre oldukça geri kaldığını göstermişlerdir [143].

Nguyen ve ark. (2014) seyreltme sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi yöntemi ile beta-kazomorfının eş zamanlı tanımlanması ve tesbitini gerçekleştirmişlerdir. Yoğurtta BKM-7 miktarı ölçmüşler ve ölçüm limitlerini $0.01\text{-}10 \text{ ng/L}$ olarak vermişlerdir [144].

Nguyena ve ark. (2014), süt işleme sırasında beta-kazomorfınların oluşumu ve parçalanmasını araştırmışlardır. Sütte BKM'leri analiz etmek için yüksek UV-Vis ve kütle spektrometrisinin algılanmasına bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ELİZA kullanmışlardır. Ticari peynirlerde varlığa rastlamışlar, ancak bunların varlığını ticari yoğurtlarda teyit edememişlerdir [145].

De Noni ve ark. (2015), gastrointestinal sindirim sonucunda peynirlerde (Cheddar, Gorgonzola, Maasdam ve Grana Padano) in vitro ortamda BKM-7 tanımlanması üzerine araştırma yapmışlardır. Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi / Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi kullanılarak farklı peynirlerde sığır beta-kazein kaynaklı BKM-7 oluşumunu araştırmışlardır. $11.74 \text{ mg.kg}^{-1}.1^{-1}$ aralığında toplam BKM içeriğini ortaya çıkarmışlardır [146].

Minekus ve ark. (2014), standartlaştırılmış in vitro gastrointestinalin sindirim yöntemi ile BKM-7 içeriğini değerlendirmişlerdir. Mide sindirimi basamağından sonra BKM-7 sadece Cheddar ve Gorgonzola'da (sırasıyla 0.25 ve 2.87 mg.kg⁻¹.1⁻¹) bulmuşlardır [146].

Nguyen ve ark. (2015), Avustralya sütü içindeki doğal beta-casomorfinlerin LC-MS / MS ve LC-HRMS ile tanımlanması ve nicelendirilmesini araştırmışlardır. Avustralya çevresinde 14 ticari pastörize süttten BKM-7 tayini sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS /MS) ve sıvı kromatografi-yüksek çözünürlüklü (Orbitrap) kütle spektrometresi (LC-HRMS) ile yapılmıştır [147].

Şimdiye kadar BKM-7 tayini için geliştirilen tek biyosensör Parashar ve ark. (2015) tarafından geliştirilen aptamer temelli biyosensördür. Bu doğrultuda araştırmacılar, BKM-7'ye karşı afinitesi olan 155 ssDNA'yı belirlemişlerdir. Aptamerleri altın nanopartiküllerle işaretleyerek renkteki değişimi takip etmişlerdir. Enzim bağımlı aptamer-emici ölçüm (ELASA) yöntemi ile biyolojik sıvılardaki (idrar, plazma, gibi) BKM-7 miktarlarını tespit etmişlerdir. Ölçüm limitlerini 7.7-156.7 nM arasında bulmuşlardır [148]. Bu biyosensörle verilen ölçüm aralığı ng/ml hassasiyetindedir. Bizim ölçüm aralığımızla yaklaşık aynı miktarlardadır.

Çalışmamızda BKM-7 tayini için dizayn edilen manyetik boncuk temelli BKM-7 immunosensörü ile elde edilen çalışma aralığı 0.5-200 ng/ml olarak belirlenmiştir. Diğer ölçüm metotları ile karşılaştırıldığında hassasiyeti oldukça yüksek ve ölçüm aralığı geniştir. Bir tek sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi yöntemi (pg/ml) ve RIA yöntemi (fmol/ml) hassasiyeti ölçümümüzden daha fazladır. Ama bu yöntemlerin ön hazırlığı ve uygulanması yöntemimize göre daha zor ve uzundur.

Woodford'a (2009) göre teorik olarak bir bardak sütte 2-3 gr A1 beta-casein bulunmaktadır ve GİS (Gastrointestinal Sindirim) sindirimi ile bu miktar kazeinden 66 - 100 mg BKM-7 salınmaktadır. Emilim oranı kişiye göre değişmekle beraber, bu miktarın µg düzeyinde emilime tabii tutulduğu varsayılabilir [149]. Bu sonuçtan yola çıkarak, çalışmada geliştirilen ng hassasiyet düzeyine sahip olan ECELISA testimizin, BKM-7 için ölçümü için geçerli olan LC₅₀ (etkisini gösterdiği zararlı miktarı) miktarını tayin etmede yeterli olduğu görülmektedir.

4.2. Sonuç ve Öneriler

İnsan sağlığı üzerine süre gelen etkileri uzun yıllardır araştırılan ve bu sayede sürekli önemini koruyan opioid aktif peptit β -kazomorfın-7 (BKM-7)'nin süt ve süt ürünlerindeki tayin ve miktar tespiti zaman içinde süt kalitesi parametreleri ölçümleri arasına katılmıştır. BKM-7'nin A1 tip süt biyobelirteci olarak analitik yönden günlük hayata uygulanabilirliği kuvvetli ve özgüdür.

Yurtiçi ve yurtdışı literatürde ki çalışmalar incelendiğinde, şimdiye kadar hiçbir çalışmada süt ve süt ürünlerindeki BKM-7'nin miktar analizinin immunosensör analizi ile yapılmadığı görülmektedir. Bu çalışma, bu açıdan Türkiye'deki piyasa peynirlerindeki olası BKM-7 ihtivasını gösteren daha hızlı ve kolay sonuç veren yegâne çalışma niteliğindedir.

Yaptığımız bu çalışma ile pek çok hastalığın etmeni olan ve sağlık açısından her yönden önem ihtiva eden biyoaktif bir peptit olan BKM-7'nin tayininde kullanılan mevcut ELİZA yöntemlerinin aksine BKM-7'nin insan metabolizması ve ekstraksiyon yöntemleri dâhil edilmeden peynirdeki BKM-7 varlığı ve miktar tespiti mümkün kılınmıştır. Buna bağlı olarak A1 tip sütün tespitine olanak sağlayan, Türkiye' deki bu konu ile ilgili taramayı ve tayin metodunu gerçekleştiren özel bir çalışma niteliği taşımaktadır

Elde edilen sonuçlara göre özgül ve hassasiyeti ng/ml olarak bulunan immunosensör, peynir suyu dışında diğer süt ve süt ürünlerinde, çeşitli saflaştırma işlemlerinden sonra, BKM-7 miktar tayini için kullanılabilir. Geliştirilen immünosensörle peynir suyunda peptidin direk ölçümü önemli bir avantajdır. Ayrıca, sadelik, otomasyon ve gerekli enstrümantasyon sağlandığı çalışmamızda aynı anda ve tek seferde sonuç sağlayabilecek ve süt ürün kalitesi hakkında fikir veren bir metot geliştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan çoklu elektrot sistemleri (8xDRP ve 96xDRP) karşılaştırıldığında örnek miktarı tespitinde farklılıklar tespit edilmemiştir. Fakat ölçüm miktarı farklılığı ve sinyal yüksekliği bakımından 8xDRP elektrotlarının daha duyarlı ve uygun olduğu görülmüştür.

Geliştirilen immünosensörün, süt kalite ve kontrolünde önemli bir belirteç kabul edilen BKM-7 peptidinin biyolojik sıvılarda, süt ve süt ürünlerinde tespiti ve ölçümünde önemli bir yer alacağı ön görülmektedir.

Ayrıca ölçüm sistemi farklı analitler için uygulanabilir. Bu şekilde ELİZA protokolü içine farklı antikorlar dahil edilerek, birçok farklı antijenin ölçümü için de kullanılabilir. İleride bu amaçla çalışmalar yapılacaktır.

İleri ki çalışmalarda antikor bağlanmış MB'ları direk olarak numune içine koyarak, antijenin bağlanması ve devam eden protokolün uygulanmasının sağlanması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Turner, A.P.F., 1987. Biosensors: fundamentals and applicaitons. Oxford University Press, İngiltere, s; 5-7.
2. Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A. 2006. Microbial Biosensors. *Analytica Chemica Acta*, 568; 200-210.
3. Junhui, Z., Hong, C. and Ruifu, Y., 1997. DNA based biosensors. *Biotechnology Advances*, 15; 43-5
4. Çetin, B., Avşar, A., Ulusoy, A. T., 2011. Kazein içerikli besinler ve dental ürünler. **Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi**, 1 (1):24-31.
5. Hall, E.A.H.1990. Biosensors. Ch: 1 biosensors in context, Open university Press, İngiltere, s;3-30
6. Metin, M., 2010. **Sütün bileşimi ve İşlenmesi**. 9. Baskı. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, 793s.
7. Çakmakçı, S. 2008. **Peynirde olgunlaşma**, pp. 761-762. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 2008, Erzurum.
8. Çelik, Ş., Uysal, Ş., 2009. Beyaz peynirin bileşim, kalite, mikroflora ve olgunlaşması. **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, **40** (1): 141-151
9. Üçüncü, M., 2005. **Süt ve Mamulleri Teknolojisi**. Meta Basım Matbaacılık, Bornova, İzmir, 571s.
10. Tailford, A. K., Berry, C. L., Thomas, A. C., Campbell, J. H., 2003. A casein variant in cow's milk is atherogenic. **Atherosclerosis**, **170** (1): 13-19.
11. Gaiaschi, A., Beretta, B., Poiesi, C., Conti, A., Giuffrida, M.G., Galli, C.L., Restani, P., 2000. Proteolysis of α - casein as a marker of grana padanocheese ripening. **Journal of Dairy Science**, **83** (1): 2733-2739.
12. Çetin, B., Avşar, A., Ulusoy, A. T., 2011. Kazein içerikli besinler ve dental ürünler. **Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi**, 1 (1):24-31.
13. Woodford, K., 2009. Devil in the milk : illness, health, and politics of A1 and A2 milkj. Chelsea Gren Publishing Company, USA

14. Macaud, C., Zhao, Q., Ricart, G., Piot, J. M., 1999. Rapid detection of a casomorphin and new casomorphin – like peptide from a peptic casein hydrolysate by spectral comparison and second order derivative spectroscopy during HPLC analysis. **Journal Of Liquid Chromatography**, 22 (3):401-418
15. Zoghbi, S., ET all.,2006. Beta- Casomorphin -7 regulates the secretion and expression of gastro intestinal mucins through a –opioid pathway, **American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology**, 209:1105-G1113.
16. Juan – Garcia , A., Font, G., Juan , C., Pico, Y., 2009. Nanoelectrospray with ion-trap mass spectrometry for the determination of beta- casomorphins in derived milk product. **Talanta** 80 (1) :294-306
17. Ceballos, L. S., Morales, E. R., Aderve, G., Castro , J. D., Martinez. L. P., Sampeloya, M. R. S., 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal Of Food Composition And Analysis**, 22 (1):322-329
18. Ünal, R. N., Besler, H. T., 2006. Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Ankara.
19. Anonim, 2002. İstanbul Ticaret Odası, **Dünya ve Türkiye’de Süt ve Süt Ürünleri Sanayinde Gelişmeler**, Yayın No: 2002-7.
20. Milli Eğitim Bakanlığı, 2011. **Süt ve ürünleri** 850CK0020 Çevre Sağlığı. Ankara.
21. Ünal, R. N., Besler, H. T., 2006. Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Ankara.
22. Anonim, 2002. İstanbul Ticaret Odası, **Dünya ve Türkiye’de Süt ve Süt Ürünleri Sanayinde Gelişmeler**, Yayın No: 2002-7.
23. Toelstede, S., Hofmann, T., 2008. Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolites in Gouda cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (1): 2795–2804.
24. Küçüköner, E., 2011. **Peynir ve yoğurt oluşum mekanizması**, pp. 26-33. 1. Ulusal Helal ve Sağlık Gıda Kongresi, 19 - 20 Kasım 2011, Vakıflar Genel Müdürlüğü Kongre Salonu, Kızılay/Ankara, 2013s.

25. Ng-Kwai-Hang, K. F., Grosclaude F., 2002. Genetic polymorphism of milk proteins. **Advanced Dairy Chemistry Proteins, Parts A&B. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1** (1): 739-816.
26. Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., et al., 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science, 87** (1):1641-1674.
27. Yin, H., Miao, J., Zhang, Y., 2010. Protective effect of β -casomorphin-7 on type 1 diabetes rats induced with streptozotocin. **Peptides, 31** (9): 1725–1729.
28. Mclachlan, C. N. S., 2001. β -casein A1 ischaemic heart disease mortality and other illnesses. **Medical Hypotheses, 56** (2): 262-272.
29. Mishra, B. P., Mukesh, M., Prakash, B., Sodhi, M., Kapila, R., Kishore, A., et al., 2009. Status of milk protein, β -casein variants among Indian milch animals. **Indian Journal of Animal Sciences, 79** (7): 722-5.
30. Woodford, K., 2009. Devil in the milk: illness, health, and politics of A1 and A2 milk. Chelsea Green Publishing Company, USA.
31. Özcan, T., Delikanlı, B., 2011. Gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde peyniraltı suyu protein katkılarının fonksiyonel etkileri. **Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25** (2):77-88.
32. Stuknyte, M., De Noni, I., Guglielmetti, S., Minuzzo, M., Mora, D., 2011. Potential immunomodulatory activity of bovine casein hydrolysates produced after digestion with proteinases of lactic acid bacteria, **International Dairy Journal, 21** (10): 763-769.
33. Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal, 16** (1): 945–960.
34. Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A, Bonizzi L., 2012. Farm animal milk proteomics. **Journal of Proteomics, 75** (14): 4259-74.
35. Durlu-Özkaya, F., 2001. Salamura Beyaz peynirlerden izole edilen bazı laktokokenterokok ve laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyojen amin oluşumu açısından karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 63 s.

36. Kurek, M., Przybilla, B., Hermann, K., Ring, J., 1992. A naturally occurring opioid peptide from cow's milk beta-casomorphine-7 is a direct histamine releaser in man. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, **97** (2): 115-120.
37. Foss-Freitas, M. C., Foss, N. T., Donadi, E. A., Foss, M. C., 2008. Effect of the glycemic control on intracellular cytokine production from peripheral blood mononuclear cells of type 1 and type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, **82** (1): 329-334.
38. Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., 2011. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. **Review Article International Dairy Journal**, **21** (1): 377-401.
39. Mills, S., Stanton, C., Hill, C., Ross, R. P., 2011. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. **Annual Review of Food Science Technology**, **2** (1): 299-329.
40. Dogan, Y., Akarsu, S., Ustundag, B., Yilmaz, E., Gurgoze, M. K., 2006. Serum IL-1 β , IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. **Mediators of Inflammation**, **2006** (1): 59206.
41. Sharma, S., Singh, R., Rana, S., 2011. Bioactive peptides. **International Journal of Bioautomation**, **15** (4):223-250.
42. Eriksen, E. K., Vegarud, G. E., Langsrud, T., Almaas, H., Lea, T., 2008. Effect of milk proteins and their hydrolysates on in vitro immune responses. **Small Ruminant Research**. **79** (1):29–37.
43. Pepe, G., Tenore, G. C., Mastrocinque, R., Stusio, P., Campiglia, P., 2013. Potential anticarcinogenic peptides from bovine milk hindawi publishing corporation. **Journal of Amino Acids**, **2013** (1): 939804, 7 p.
44. Yin, H., Miao, J., Ma, C., Sun, G., Zhang, Y., 2012. β -Casomorphin-7 cause decreasing in oxidative stress and inhibiting NF- κ B-iNOS-NO signal pathway in pancreas of diabetes rats. **Journal of Food Science**, **77** (2): 278–282.

45. Park, Y. W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F.W., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, **68** (1-2): 88-113.
46. Potocnik, K., Gantner, V., Kuterovac, K., Cividini. A., 2011. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. **Mljekarstvo**, **61** (2): 107-113.
47. Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y., 2008. Composition of goat and sheep milk products. **Small Ruminant Research** **79** (1): 57-72.
48. Ceballos, L. S., Morales, E. R., Adarve, G. T., Castro, J. D., Martinez, L. P., Sampelayo, M. R. S., 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, **22** (1): 322–329.
49. Tholstrup, T., 2006. Dairy products and cardiovascular disease. **Current Opinion in Lipidology**. **17** (1): 1-10
50. The Great Plains Laboratory, Inc., Gluten/Casein Peptides Test Brochure
51. Dettmer, K., Hanna, D., Whetstone, P., Hansen, R., Hammock, B. D., 2007. Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE–HPLC–tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **388** (1): 1643–1651.
52. Reichelt, W. H., Stensrud, M. B., Reichelt, K. L., 1998. Peptide excretion in Celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, **26** (1): 305–309.
53. Whiteley, P., Shattock, K., Carr, P., Hooper, M., Todd, L., 2010. How could a gluten- and casein-free diet ameliorate symptoms associated with autism spectrum conditions? **Journal of Autism Insights**, **2** (1): 39–53.
54. Jarmolowska, B., et al., 2007. Opioid activity of humana formula for newborns. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **87** (1): 2247-2250.
55. Tveiten D., Reichelt K., 2012. Exorphins in urine from schizoaffective psychotics, **Open Journal of Psychiatry**, **2** (1): 220-227.

56. Reichelt, K. L., Michael L., Gardner, G., 2012. Genetic and dietary factors related to schizophrenia. **Open Journal of Psychiatry**, **2** (1): 12-20
57. Liu, Y., Heiberg,T., Reichelt, K. L., 2007. Towards a possible aetiology for depressions? **Behavioral and Brain Functions**, **3** (1): 47., 7 p.
58. Babacan, F.,Topçu, A., Söyletir, G., Doğanay, M., 1996. İnfeksiyon Hastalıklarının immünoşerolojisi, İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 235 s.
59. Reichlin, M., 1980. Use of glutaraldehyde as a coupling agent for proteins and peptides. **Methods in Enzymology**, **70** (1): 159-165.
60. Abbas, K., Lichtman, A., Pober, J., 2011. Quantitation of Antigen. In: Cellular and Molecular Immunology, 2nd Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 560p.
61. Peninsula Laboratories, LLC A Member of the Bachem Group, Peptide Enzyme Immunoassay (EIA) Protocols.
62. Yıldız A., Genç Ö., Bektas S., Enstrümantal Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, (1997). Pp: 285.
63. Adams R.N., Electrochemistry at Solid Electrodes, New York, Decker, (1969).
64. Lee, H., Shan, G., Watanabe, T., Stoutamire, D., W., Gee, S., J., Hammock B., D., 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid deltamethrin, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **50**: 5526-5532.
- 65.Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S., 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, **16** (1): **121-131**.
- 66.Zhai, J., Cui, H., Yang, R., 1997. DNA based biosensors. **Biotechnology Advances**, **15** (1): 43-58.
67. Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B. D., 2002. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, **17** (5): 345-359.
- 68.Mello, L. D., Kubota, L. T., 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, **77** (2): 237-256.

69. Vargas-Bernal, R., Rodriguez-Miranda, E., Herrera- Perez, G., 2012. Pesticides-Advances in Chemical and Botanical Pesticides. (Editor: Soundararajan, R.P.). **Intech**, Croatia, pp. 329-356.
70. Newman, J. D., Tigwell, L. J., Warner, P. J., Turner, A. P. F., 2001. Biosensors: boldly going into the new millennium. **Sensor Review**, **21** (4): 268-271.
71. Clark, L. C., Lyons, C., 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **102** (1): 29-45.
72. Chaubey, A. and Malhotra, B.D., Mediated Biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, **17** (2002), 441-456.
73. Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, J. M., Young, M. M., Luong, J. H., 2000. Fiber-Optic Biosensors. Trends and Advances. **Analytical Sciences**, **16** (7): 677-692.
74. Gürsoy, O., Kınık, Ö., Kavas, G., 2002. Gıda güvenliği ve HACCP Kapsamında Süt Teknolojisi Açısından Biyosensörlerin Değerlendirilmesi. **Dünya Yayıncılık**, 62-68 s.
75. Luong, J. H. T., Bouvrette, P., Male, K. B., 1997. Developments and applications of biosensors in food analysis. **TIBTECH September 15**: 369-377.
76. Chang, S. C., Rawson, K., McNeil, C. J., 2002. Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols. **Biosensors and Bioelectronics**, **17** (11-12): 1015-1023.
77. Şenyurt, Ö., 2008. Development of Paper Type Tyrosinase Biosensor. Biotechnology. Ankara, Middle East Technical University. **Master of Science**: 58.
78. Cesarino, I., Moraes, F. C., Lanza, M. R., Machado, S. A., 2012. Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes. **Food Chemistry**, **135** (3): 873-879.
79. Diviés C., 1975. Remarks on ethanol oxidation by an "*Acetobacter xylinum*" microbial electrode (author's transl). **Ann Microbiol**, **126** (2):175-86.

80. Malhotra, B. D., Chaubey, A., 2003. Biosensor for clinical diagnostics industry. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **91**: 117-127.
81. Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A., 2006. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta**, **568 (1)**: 200-210.
82. Otlu, B., 2011. Biyosensörler: biyoreseptör moleküller. 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11). 16-18 Mayıs, **Bildiriler Kitabı** Sayfa: 5-7.
83. Ogawa, A., Maeda, M., 2008. An artificial aptazyme-based riboswitch and its cascading system in E. coli. **ChemBioChem**, **9**: 206-209.
84. Nunez, O., Moyano, E., Galceran, M. T., 2005. LC–MS/MS analysis of organic toxics in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, **24 (7)**: 683-703.
85. Li, Y., 2006. CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering. **ASABE**, pp. 52-93
86. Singh, S., Solanki, P. R., Pandey, M. K., Malhotra, B. D., 2006. Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for application to cholesterol biosensor. **Analytica Chimica Acta**, **568**: 126-132.
87. Niculescu, M., Nistor, C., Frebort, I., Pec, P., Mattiasson, B., Csoregi, E., 2000. Redox hidrogel-based amperometric bienzyme electrode for fish freshness monitoring. **Analytical Chemistry**, **72**: 1591-1597.
88. Ruan, C. M., Wang, H., Li, Y., 2002. A bienzyme electrochemical biosensor coupled with immunomagnetic separation for rapid detection of Escherichia coli O157:H7 in food samples. *Trans. ASAE*, **45 (1)**: 249-255.
89. Liu, G., Lin, Y., 2006. Biosensor based on self-assembling acetylcholinesterase on carbon nanotubes for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides. **Analytical Chemistry**, **78**: 835-843.
90. Schulze, H., Scherbaum, E., Anastassiades, M., Vorlová, S., Rolf, D., Schmid, R. D., Bachmann, T. T., 2002. Development, validation, and application of an

acetylcholinesterase-biosensor test for the direct detection of insecticide residues in infant food. **Biosensors and Bioelectronics**, **17**: 1095-1105.

91. Kröger, S., Setford S. J., Turner, A. P. F., 1998. Immunosensor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in aqueous/organic solvent soil extracts. **Analytical Chemistry**, **70** (23): 5047–5053.
92. Deo, R. P., Wang, J., Block, I., Mulchandani, A., Joshi, K. A., Trojanowicz, M., Lin, Y., 2005. Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor. **Analytica Chimica Acta**, **530** (2): 185-189.
93. Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chen, W., 1998. Enzyme biosensor for determination of organophosphates. **Field Analytical Chemistry and Technology**, **2** (6): 363-369.
94. Karakaş, C., 2009. The Development of Alkaline Phosphatase Based Paper Bioreporter for Evaluation of Milk Pasteurization Biotechnology. Ankara, Middle East Technical University. **Master of Science**: 148.
95. Malhotra, B. D., Singhal, R., Chaubey, A., Sharma S. K., Kumar, A., 2005. Recent trends in biosensors. **Current Applied Physics**, **5**: 92-97.
96. Sadana, A., 2006. Binding and Dissociation Kinetics for Different Biosensor Applications Using Fractals, **Elsevier**, Amsterdam, 343 pp.
97. Biran, I., Rissin, D., Ron, E., Walt. D., 2003. Optical imaging fiber-based live bacterial cell array biosensor. **Analytical Biochemistry**, **315**: 106-113.
98. Illanes, A., 2008. Enzyme Biocatalysis Principles and Applications. **Springer**, pp. 38
99. Sarma, A. K., Vatsyayan P., Goswami P., Minteer S. D., 2009., Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, pp. 2313-
100. Freire, R. S., Pessoa, C. A., Mello, L. D., Kubota, L. T., 2003. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **14** (2): 230-243.

101. Russell, R. . M., Robertson, J. L., Savin, N. E., 1977. POLO: A new computer program for probit analysis. **Bulletin of the Entomological Society of America**, **23** (3): 209-213.
102. Jusoh, N., Aziz, A. A., 2006. Immobilization of Glucose Oxidase and Ferrocene Redox Polymer in Cross-Linked Poly (Vinyl Alcohol) with Bovine Serum Albumin as Protein Stabilizer, pp. 1-5. **Regional Postgraduate Conference On Engineering and Science**, 26 -27 July 2006, Malaysia.
103. Liébana, S., Brandão, D., Alegret, S., Pividori, M. I., 2014. Electrochemical immunosensors, genosensors and phagosensors for Salmonella detection, **Analytical Methods**, **6**: 8858-8873.
104. Hart, J. P., Wring, S. A., 1997. Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, **16** (2): **89-103**.
105. Albareda-Sirvent, M., Merkoci, A., Alegret, S., 2000. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **69** (1): 153-163.
106. Albareda-Sirvent, M., Merkoçi, A., Alegret, S., 2001. Thick-film biosensors for pesticides produced by screen-printing of graphite–epoxy composite and biocomposite pastes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **79** (1): 48-57.
107. Moreno-Guzmán, M., González-Cortés, M. A., Yáñez-Sedeno, P., Pingarrón, J. M., 2011. A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles. **Analytica Chimica Acta**, **692** (1-2): 125-30.
108. Taleat, Z., Khoshroo, A., Ardakani, M. M., 2014. Screen-printed electrodes for biosensing: a review. **Microchimica Acta**, **181**: 865–891.
109. Kinga Zór, Alexandru Zabara, Lo Gorton, Mihaela Nistor. Development of amperometric immunoassays (AIAs) for calpastatin and calpain with possible applications in the biomedical field. **Sensors and Actuators B** 152 (2011) 248–253.

110. Kinga Zor, Katarzyna Dymek, Roberto Ortiz, Audrey M. Faure, Ebru Saatci, Lo Gorton, Ronald Bardsley, Mihaela Nistor. Indirect, non-competitive amperometric immunoassay for accurate quantification of calpastatin, a meat tenderness marker, in bovine muscle. *Food Chemistry* 133 (2012) 598–603.
111. Kaminski, S., Cieslinska, A., Kostyra, E. J., 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, **48** (3): 189-98.
112. Caroli, A. M., Chessa, S., Erhardt, G. J., 2009. Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, **92** (1): 5335-5352.
113. Dinç, H., 2009. Genotyping of beta-kazein, kappa-kazein and beta-laktoglobulin genes in turkish native cattle breeds and efforts to delineate BCM-7 on human PBMC. METU Graduate School of Natural and Applied Sciences, **PhD Thesis**, Ankara, 208 p.
114. Mohammad Raies UIHaq, Raje ev Kapila, Suman Kapila. *Food Chemistry*, 168 (2015) 70–79
115. Tora Asledottir , Thao T. Le , Bjørn Petrat-Melin , Tove G. Devold , Lotte B. Larsen , Gerd E. Vegarud , **International Dairy Journal** 71 (2017) 98e106
116. Scientific Report of EFSA Prepared by a DATEX, 2009. Working group on the potential health impact of beta-casomorphins and related peptides, **EFSA Scientific Report**, **231** (1): 1-107.
117. De Noni I., 2008. Release of β -casomorphins-5 and -7 during simulated gastrointestinal digestion of bovine β -casein variants and milk-based infant formulas. **Food Chemistry**, **110** (4):897-903.
118. Woodford, K., 2009. Devil in the milk: illness, health, and politics of A1 and A2 milk. **Chelsea Green Publishing Company**, USA.
119. Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A, Bonizzi L., 2012. Farm animal milk proteomics. **Journal of Proteomics**, **75** (14): 4259-74.
120. Kurek, M., Przybilla, B., Hermann, K., Ring, J., 1992. A naturally occurring opioid peptide from cow's milk beta-casomorphine-7 is a direct histamine

- releaser in man. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, **97** (2): 115-120.
121. Yin, H., Miao, J., Zhang, Y., 2010. Protective effect of β -casomorphin-7 on type 1 diabetes rats induced with streptozotocin. *Peptides*, **31** (9): 1725–1729.
 122. Mclachian, C. N. S., 2001. β -casein A1 ischaemic heart disease mortality and other illnesses. *Medical Hypotheses*, **56** (2): 262-272.
 123. Mclachian, C. N. S., 2001. β -casein A1 ischaemic heart disease mortality and other illnesses. *Medical Hypotheses*, **56** (2): 262-272.
 124. Jarmolowska, B., Kostyra E., Krawczuk, S., Kostyra., H. 1999. β -Casomorphinisolated from brie cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79** (1): 1788-1792.
 125. Stanisaw Kaminski, Anna Cieoelinska, Elzbieta Kostyra *J Appl Genet* **48**(3), 2007, **Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health** **48**(3), ,pp. 189–198pp. 189–198
 126. Ivano De Noni, Richard J. FitzGerald, Hannu J. T. Korhonen, Yves Le Roux, Chris T. Livesey, Inga Thorsdottir, Daniel Tomé, **Renger Witkamp. EFSA Scientific Report** (2009) 231,1-107
 127. William A. Banks *Peptides and the blood–brain barrier* **72** (2015) 16–19
 128. Oleg Sokolova, Natalya Kosta, Olga Andreevaa, Ekaterina Korneevab, Viktor Meshavkina, Yulia Tarakanovaa, Aleksander Dadayanc, Yurii Zolotarevc, Sergei Grachevd, Inna Mikheevab, Oleg Varlamove, Andrey Zozulyaaa. *Peptides* **56** (2014) 68–71
 129. Josh Lister, Paul J. Fletcher , José N. Nobrega , Gary Remington . *Pharmacology, Behavioral effects of food-derived opioid-like peptides in rodents: Implications for schizophrenia?* **134** (2015) 70–78
 130. Wei Zhang, Jinfeng Miao, Chang Ma, Dongning Han, Yuanshu Zhang. β -Casomorphin-7 attenuates the development of nephropathy in type I diabetes via inhibition of epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells. *Peptides* **36** (2012) 186–191.

131. Dong-Ning Han, Dong-Hui Zhang, Li-Ping Wang, Yuan-Shu Zhang Protective effect of α -casomorphin-7 on cardiomyopathy of streptozotocin-induced diabetic rats via inhibition of hyperglycemia and oxidative stress 44 (2013) 120–126.
132. Beata Jarmołowska, Małgorzata Teodorowicz, Ewa Fiedorowicz, Edyta Sienkiewicz-Szłapka, Michał Matysiewicz, Elżbieta Kostyra *Peptides* 49 (2013) 59–67
133. Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamone, G., Caira, S., Di Luccia, A., Monica, S., Addeo, F., 2010. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: biological and toxicological implications. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, **878** (3-4): 295-308.
134. Macaud, C., Zhao, Q., Ricart, G., Piot, J. M., 1999. Rapid detection of a casomorphin and new casomorphin-like peptide from a peptic casein hydrolysate by spectral comparison and second order derivative spectroscopy during HPLC analysis. **Journal of Liquid Chromatography**, 22 (3):401-418.
135. Edmund, R. S., Gang Fang, C., Jeronimus-Stratingh, M., Andries, P., Poolman, B., Konings, W. N., 1998. Reconstruction of the proteolytic pathway for utilization of β -casein by *Lactococcus lactis*. **Molecular Microbiology**, **27** (1): 1107-111.
136. Macaud, C., Zhao, Q., Ricart, G., Piot, J. M., 1999. Rapid detection of a casomorphin and new casomorphin-like peptide from a peptic casein hydrolysate by spectral comparison and second order derivative spectroscopy during HPLC analysis. **Journal of Liquid Chromatography**, 22 (3):401-418.
137. Senocq, D., Dupont, D., Rolet-Répécaud, O., Leveux, D., 2002. ELISA for monitoring the cleavage of β -casein at site Lys28–Lys29 by plasmin during Comte cheese ripening. **Journal of Dairy Research**, 69 (3): 491-500.
138. Ana Juan-Garcia., Guillermina Font, Cristina Juan, Yolanda Pico Talanta Nanoelectrospray with ion-trap mass spectrometry for the determination of beta-casomorphins in derived milk products 80 (2009) 294–306
139. Juan-Garcia, A., Font, G., Juan, C., Pico, Y., 2009. Nanoelectrospray with ion-trap mass spectrometry for the determination of beta-casomorphins in derived milk products. **Talanta** 80 (1): 294- 306.

140. E. Sienkiewicz-Szlapka, B. Jarmłowska, S. Krawczuk, E. Kostyra, H. Kostyra, M. Iwan. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. **International Dairy Journal** 19 (2009) 258–263
141. Sienkiewicz-Szlapkaa, E., Jarmołowskaa, B., Krawczuka, S., Kostyraa, E., Kostyrab, H., Iwan, M., 2009. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. **International Dairy Journal**, 19 (4): 258–263.
142. Korhonen, H., 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1 (2): 177–187.
143. Kost NV1, Sokolov OY, Kurasova OB, Dmitriev AD, Tarakanova JN, Gabaeva MV, Zolotarev YA, Dadayan AK, Grachev SA, Korneeva EV, Mikheeva IG, Zozulya AA. Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. **Peptides**. 2009. 10):1854-60
144. D.D. Nguyen , V.A. Solah , S.K. Johnson , J.W.A. Charrois , F. Busetti , Food Chemistry Identification and quantification of native beta-casomorphins in Australian milk by LC–MS/MS and LC–HRMS 146 (2014) 345–352
145. D. D. Nguyena, S. K. Johnsona, F. Busettib & V. A. Solaha (2014)Formation and Degradation of Betacasomorphins in Dairy Processing, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, DOI: 10.1080/10408398.2012.740102
146. Ivano De Noni, Milda Stuknyt, Stefano Cattaneo LWT - Food Science and Technology Identification of b-casomorphins 3 to 7 in cheeses and in their in vitro gastrointestinal digestates 63 (2015) 550e555
147. D.D. Nguyen, F. Busetti, S.K. Johnson, V.A. Solah. Journal of Food Composition and Analysis Isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry for simultaneous identification and quantification of beta-casomorphin 5 and beta-casomorphin 7 in yoghurt 44 (2015) 102–110
148. Yudhishtir S. Rajput, Abhishek Parashar and Rajan Sharma “Aptamer-Based Sensing of β -Casomorphin-7”, **J. Agric. Food Chem.** 2015, 63, 2647-2653.
149. Yin, H., Miao, J., Zhang, Y., 2010. Protective effect of β -casomorphin-7 on type 1 diabetes rats induced with streptozotocin. **Peptides**, 31 (9): 1725–1729

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Tuğba Ferak
 Uyruğu: Türkiye (TC)
 Doğum Tarihi ve Yeri: 21 Şubat 1990, Niğde
 Medeni Durumu: Evli
 Tel: 530 043 40 37
 e-mail: tugba.ozkaya@bysproje.com
 Yazışma Adresi: Talas Mevlana Mah. Şehit Naci Akarsu Sok. Altın Hayat 5 Apt.
 Kat:13 No:51 Talas/ Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü – Biyoloji	2017
Lisans	Erciyes Üniversitesi / Fen Fakültesi – Biyoloji	2013
Lise	Sümer Lisesi(YDA)	2008

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013-2015.	Bys Grup Bilişim Sistemleri Danışmanlık Tic. Ve San. Ltd. Şti.	Proje Asistanı

KATILDIĞI KONFERANSLAR:

- 2nd International Congress On Biosensors, İzmir, 2015
- 5th International Conference on Biosensing Technology, Italy, 2016
- 4th Global nanotechnology Congress and EXPO, Dubai, 2018

GÖREV ALDIĞI PROJELER :

1. TÜBİTAK 1509 Uluslararası Sanayi Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamındaki 91358 numaralı ve “PRINTED ELECTROCHEMICAL ELISA, PRINTEDELISA” başlıklı projesi

SERTİFİKALARI:

No	Tanımı	Niteliği	Yurt içi / dışı	Yılı	Süresi
1	Bilgisayar İşletmenliği Ve Operatörlük Kursu (06/07/2009-27/08/2009)	Kurs	Yurt içi	2009	160 saat
2	Türk Telekom Akedemi Geleceğe Dair – Madalyonun Öteki Yüzü	Seminer	Yurt içi	2013	1 gün
3	Proje Park 15 Biyo-Med Ar-Ge Proje Pazarı Kayseri	Proje pazarı	Yurt içi	2014	1 gün
4	Pedagolojik Formasyon Programı(26/6/2014)	Kurs	Yurt içi	2014	4ay
5	Eppendorf Pipet kullanımı (26/06/2014)	Seminer	Yurt içi	2014	1 gün
6	Deulcome Dil Kursu(2014/2015)(4/07/2015)	Kurs	Yurtiçi	2014-2015	6 ay
7	2nd International Congress On Biosensors(1010-12/5/215)	Kongre	Yurtiçi	2015	3 gün
8	Bioanalytics using single plasmonic nanostructures	Seminer	Yurt içi	2015	1 gün
9	Molecular vibrations and Raman spectroscopy	Seminer	Yurtiçi	2015	1 gün

Yabancı dil: İngilizce