

**YÜZEY PLAZMON REZONANS (SPR) TEMELLİ
AFLATOKSİN SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE
(SPR) BASED AFLATOXIN SENSORS**

SEMRA AKGÖNÜLLÜ

PROF. DR. HANDAN YAVUZ ALAGÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

Sevgili Aileme ve Canım Melis'ime...

ÖZET

YÜZEY PLAZMON REZONANS (SPR) TEMELLİ AFLATOKSİN SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

Semra AKGÖNÜLLÜ

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Şubat 2020, 117 sayfa

Mikotoksinler, hasattan önce veya hasat sonrası depolama sırasında ve farklı türlerde tarımsal ürünleri kirleten çeşitli mantar grupları tarafından üretilen toksik metabolitlerdir. Aflatoksinler (AF) insan ve hayvan sağlığı üzerinde zararlı etkiye sahip mikotoksinlerdir. Aflatoksinler özellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* mantar türleri tarafından doğal olarak üretilen oldukça zehirli ve kanserojen ikincil metabolitlerdir. Aflatoksinler mutajenik, teratojenik ve son derece hepatotoksik ve hepatokarsinojenik etkiler gösterirler. Uluslararası kanser araştırma ajansı tarafından Grup 1 kanserojenler olarak sınıflandırılmıştır. Aflatoksinler çeşitli tiplere ayrılır; aflatoksin B1, B2, M1 ve M2. Aflatoksin B1 (AFB1) tarım ürünlerinde oldukça yaygın olarak bulunur ve aflatoksinler arasında en yüksek toksisiteye sahiptir. AFB1'in hidroksilenmiş metaboliti olan Aflatoksin M1 (AFM1), hayvansal dokularda ve sıvılarda (süt ve idrar) bulunur. Son derece yüksek toksisiteleri ve kanserojen olmaları nedeniyle, gıda maddelerinde maksimum aflatoksin kalıntı seviyeleri kontrolü birçok ülke tarafından yürütülmektedir. Aflatoksinler büyük risk taşıyan mikotoksinlerdir ve bu nedenle faydalı ve pratik olabilecek çok çeşitli analitik ve yüksek hassasiyetli tayin teknikleri hakkında önemli araştırmalar yapılmalıdır.

Etiketsiz optik biyosensörler yüksek hassasiyet, doğrudan ve gerçek zamanlı ölçüm gibi çeşitli avantajlar sağladıkları için birçok analitin analizi için ilgi çekici bir seçenektir. Sensör tepkisi analitin büyüklüğü ile ilgili olduğundan küçük moleküller için etiketsiz optik sensörlerin tasarlanması ile bu alandaki bazı sınırlamaların üstesinden gelmek için son zamanlarda immobilizasyon stratejileri geliştirilmiştir. Yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör sistemi biyomoleküler etkileşimlerin izlemesinde kullanılan optik temelli güçlü bir araçtır. Biyospesifik etkileşimleri doğrudan ve basit bir şekilde kimyasal etiketleme olmadan gerçek zamanlı olarak hassasiyetle ölçmek için SPR temelli biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Moleküler baskılama teknolojisi ilk olarak 1972'de Wulff ve Sarhan tarafından ileri sürülmüştür. Teknoloji, bir kalıp molekül etrafında polimerizasyonu ve ardından seçici tanıma bölgelerini bırakmak için kalıp molekülün ilgili matrislerden uzaklaştırılmasını içermektedir. Moleküler baskılanmış polimerler, kararlılıkları, düşük maliyetleri, yüksek afiniteleri ve üstün substrat tanıma yetenekleri ve hazırlanma kolaylığı nedeniyle, birçok bilimsel ve teknik alanda moleküler tanıma materyalleri olarak kullanılmıştır.

Sunulan tez çalışmasında, AFB1 ve AFM1'in gıdalarda hızlı ve hassas tayini için moleküler baskılama temelli yüzey plazmon rezonans (SPR) nanosensörler hazırlanmıştır. AFB1 ve AFM1 tayini için hassas ve seçici baskılanmış bir optik sensör, altın çip yüzeyinde altın nanopartiküllerin (AuNP'ler) gömülü olarak modifikasyonu ve ince bir baskılanmış polimer film tasarlanarak hazırlanmıştır. Düşük molekül ağırlığına sahip mikotoksinler altın nanopartiküller ile konjuge edilmiş polimer filmin duyarlılığı artırılarak tayin edilmiştir. Poly(2-hidroksietil metakrilat) temelli polimer filmde N-metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır. Altın nanopartikül amplifikasyon stratejisinin etkinliği tartışılmıştır. SPR nanosensörde tarım ürünlerinde AFB1 ve sütteki AFM1'in ~8 dakika analiz süresiyle çok hassas bir şekilde tayini gerçekleştirilmiştir. AFB1 ve AFM1 için belirlenen tayin sınırı (LOD) değerleri sırasıyla 1.04 pg.mL^{-1} ve 0.4 pg.mL^{-1} olarak bulunmuştur. Ayrıca AFB1 ile kirletilmiş mısır ve fıstık gıda örneklerinde AFB1 tayini gerçekleştirilmiştir. Rastgele bir mandıracıdan alınan ham süt örneklerinde ise AFM1 tayini gerçekleştirilmiştir. Aflatoksin baskılanmış sensörlerin tekrarlanabilirliği ve raf ömrü kararlılıkları incelenmiştir. Tasarlanan çiplerin polimer film yüzey homojenliğini belirlemek için

Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izotermi kullanılarak hesaplanmıştır. Hem AFB1 hemde AFM1 baskılanmış nanofilm kaplı çiplerde adsorpsiyon davranışı, Langmuir modeline uygun olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, Altın Nanopartiküller, Moleküler Baskılanmış Polimerler, Yüzey Plazmon Rezonans Sensor.

ABSTRACT

PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) BASED AFLATOXIN SENSORS

Semra AKGÖNÜLLÜ

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

February 2020, 117 pages

Mycotoxins are toxic metabolites produced by various groups of fungi that pollute different types of agricultural products before and after harvest storage. Aflatoxins (AFs) are mycotoxins that harm human and animal health. AFs are highly toxic and carcinogenic secondary metabolites that are naturally produced by fungi species, especially *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. AFs display mutagenic, teratogenic and highly hepatotoxic and hepatocarcinogenic effects. It is categorized as a Group I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC). AFs are divided into various types; aflatoxin B1, B2, M1 and M2. Aflatoxin B1 (AFB1) is very common in agricultural products and has the highest toxicity among aflatoxins. Aflatoxin M1 (AFM1), the hydroxylated metabolite of AFB1, is found in animal tissues and liquids (milk and urine). Due to their extremely high toxicity and carcinogenicity, control of maximum aflatoxin residue levels in foodstuffs is carried out by many countries. Aflatoxins are high risk mycotoxins and therefore significant research should be conducted on a wide variety of analytical and high-precision assay techniques that can be useful and practical.

Label free optical biosensors are an interesting option for the detection of many analytes because they offer several advantages such as high sensitivity, direct and real-time measurement. Since sensor response is related to the size of the analyte, immobilization strategies have recently been developed to overcome some limitations in this area by designing label free optical sensors for small molecules. The surface plasmon resonance (SPR) sensor system is a powerful optical-based tool for monitoring biomolecular interactions. SPR-based biosensors are widely used to simple and directly detection biospecific interactions in real time without chemical labeling.

Molecular imprinting technology was first proposed by Wulff and Sarhan in 1972. The technology includes polymerization around a template molecule followed by removal of the template from the respective matrices to leave selective recognition sites. Molecularly imprinted polymers have been used in many scientific and technical fields as molecular recognition materials due to their stability, cost effective, high affinity and superior substrate recognition capabilities and ease of preparation.

In this thesis, molecularly imprinted based surface plasmon resonance (SPR) nanosensors have been prepared for fast and sensitive detection of AFB1 and AFM1 in food. A sensitive and selectively imprinted optical sensor for the detection of AFB1 and AFM1 was prepared by embedding modification of gold nanoparticles (AuNPs) on the gold chip surface and designing a thin imprinted polymer film. Low molecular weight mycotoxins were detected by enhanced the sensitivity of the polymer film conjugated with gold nanoparticles. N-methacryloyl-L-phenylalanine (MAPA) as a functional monomer is utilized in the polymer film based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate). The effectiveness of the gold nanoparticles amplification strategy is discussed. Highly sensitive detection of AFB1 and AFM1 in milk for ~8 minutes analysis time was performed in the SPR nanosensor. The detection limit (LOD) values determined for AFB1 and AFM1 were 1.04 pg.mL^{-1} and 0.4 pg.mL^{-1} , respectively. Also, AFB1 determination was carried out in corn and peanut samples contaminated with AFB1. In a random dairy farmer milk and raw milk samples, AFM1 determination was performed. Repeatability and storage stability of the aflatoxin imprinted sensors were investigated. The polymer film of the designed chips was calculated using Scatchard, Langmuir, Freundlich and Langmuir-Freundlich adsorption isotherms to determine the

surface homogeneity. Adsorption behavior in both AFB1 and AFM1 imprinted nanofilm-coated chips was found to fit with the Langmuir model.

Keywords: Aflatoxin, Gold Nanoparticles, Molecularly Imprinted Polymers, Surface Plasmon Resonance Sensor.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca desteği, sevgisi ve paylaştığı bilgiler ışığında ilerlediğim bu yolda bana inandığı ve güvendiği her zaman yanımda olduğu için değerli hocam danışmanım Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e,

2011 yılında yüksek lisans eğitimime başladığım günden bu zamana desteğini hep gördüğüm ve her zaman yanımda olan, bu akademik yolculuğumda bilgilerinden ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim ve öğremeye halen devam ettiğim kıymetli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Her başım sıkıştığında yanına koştüğüm ve desteğini hiç esirgmeden paylaşan, anlatan, sabırla dinleyen değerli hocam Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a,

Desteklerini hep hissettiğim değerli hocalarım Doç. Dr. Nilay Bereli ve Doç. Dr. Deniz Türkmen'e,

Her zaman güzel destekleri için değerli hocam Doç. Dr. Dilek Battal'a

Hem yoldaş oldular hem çok iyi arkadaş sevgili Dr. Yeşeren Saylan'a, Dr. Ilgım Göktürk'e ve Dr. Monireh Bakshspour'a,

Değerli Bioreg Ailesi çalışma arkadaşlarıma paylaşımları ve sevgileri için,

Bazen mesafeler engel olsada beni her zaman düşünen ve yanımda olan canım dostlarıma,

Doğduğu andan itibaren bana teyze olmanın ayrıcalığını yaşatan canım Melis'ime, ailemizin yeni süper kahramanları Alperen Kemal ve İsmail'e,

Beni bu günlere getiren, bana hep inanan ve güvenen en büyük destekçilerim canım ailem anneme, babama, ablama ve kardeşlerime,

Gönülden çok teşekkür ediyorum...

Semra Akgönüllü

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Mikotoksinler	5
2.2. Fitopatojenik ve Mikotoksijenik Mantarlar.....	10
2.2.1. <i>Fusarium</i> Türleri	10
2.2.1.1. Trikotesenler.....	11
2.2.1.2. Zearalenon.....	12
2.2.1.3. Fumonisinler.....	13
2.2.2. <i>Aspergillus</i> Türleri.....	14
2.2.3. Aflatoksinler.....	15
2.2.3.1. Aflatoksin B1	19
2.2.3.2. Aflatoksin M1	21
2.2.3.3. Okratoksin A	24
2.3. Küçük Moleküller	25
2.3.1. Küçük Moleküllerin Başlangıcı Ve Oluşumu	25
2.3.2. Küçük Moleküllerin Tayini İçin Biyosensörler	26
2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler.....	28
2.4.1. Moleküler Baskılanmanın Tarihi	30
2.4.2. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Sentezi.....	31
2.4.3. Moleküler Baskılanmış Polimer Temelli Sensörler	31
2.5. Optik Sensörler.....	32

2.6. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörler.....	33
2.7. Metal Nanopartiküller.....	38
2.7.1. Altın Nanopartiküller.....	40
2.7.2. Altın Nanopartikül Temelli Optik Sensörler	41
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	44
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	44
3.2. Optik Sistem	44
3.3. Altın Nanopartiküllerin Sentezi.....	45
3.3.1. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	45
3.3.1.1. Boyut Analizi.....	45
3.3.1.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu.....	46
3.4. N-metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) Monomerinin Sentezi	46
3.5. Aflatoksin Baskılanmış Çiplerin Hazırlanması	46
3.5.1. SPR Çip Yüzeyinin Modifikasyonu	46
3.5.2. AFB1 Baskılanmış SPR Çipin Hazırlanması.....	47
3.5.3. AFM1 Baskılanmış SPR Çipin Hazırlanması.....	48
3.5.4. Kalıp Moleküllerin Desorpsiyonu	49
3.5.5. Baskılanmamış Çiplerin Hazırlanması	49
3.6. SPR Nanosensör Çiplerinin Karakterizasyonu	49
3.6.1. FTIR-ATR	50
3.6.2. Temas Açısı	50
3.6.3. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM).....	52
3.6.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	52
3.6.5. Elipsometre	52
3.7. AFM1 ve AFB1 Tayini.....	53
3.8. Gıda Örneklerinde Aflatoksin M1 Tayini.....	54
3.8.1. Süt Örneklerinin Hazırlanması	54
3.9. Gıda Örneklerinde AFB1 Tayini	55
3.9.1. Fıstık Örneklerinin Hazırlanması.....	55
3.9.2. Mısır Örneklerinin Hazırlanması	56
3.10. Seçicilik Çalışmaları	57
3.10.1. AFB1 Baskılanmış Nanosensörün Seçiciliği.....	58

3.10.2. AFM1 Baskılanmış Nanosensörün Seçiciliği	58
3.11. Tekrar Kullanılabilirlik ve Raf Ömrü.....	58
3.12. Kinetik Modeli	59
3.13. Adsorpsiyon Modeli.....	61
3.13.1. Langmuir İzoterm Modeli	62
3.13.2. Freundlich İzoterm Modeli.....	62
3.14. Gıda Örneklerinde Aflatoksin Tayininin HPLC ile Karşılaştırılması.....	63
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	64
4.1. Sentezlenen Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyon Verileri	64
4.1.1. Altın Nanopartiküllerin Zeta-Boyut Analizi	64
4.1.2. Altın Nanopartiküllerin TEM Analizi	65
4.2. N-metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) Monomerinin Karakterizasyonu	66
4.3. Aflatoksin Baskılanmış SPR Sensör Çiplerin Karakterizasyon Sonuçları.....	66
4.3.1. FTIR-ATR Analizi	66
4.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi	67
4.3.3. Temas Açısı Analizi	69
4.3.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi	71
4.3.5. Elipsometre Analizi.....	72
4.4. Aflatoksin Tayini.....	75
4.5. Gıdalarda AFB1 Tayini.....	79
4.6. Sütte AFM1 Tayini.....	80
4.7. Baskılanmamış Nanosensör İle Aflatoksin Tayini.....	80
4.8. Aflatoksin Seçicilik Çalışmaları.....	81
4.9. Tekrarlanabilirlik Sonuçları	85
4.10. Raf Ömrü Belirleme Çalışmaları.....	86
4.11. Kinetik Modeli	87
4.12. Adsorpsiyon İzoterm Modeli	89
4.13. Gıda Örneklerinde Tayin Edilen Sonuçların HPLC ile Karşılaştırılması	93
4.14. Aflatoksin Baskılanmış Sensörler	94
5. YORUM.....	97
6. KAYNAKLAR.....	101

EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	115
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	116
ÖZGEÇMİŞ	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Yapı ve işlevsellik çeşitliliğini gösteren yaygın mikotoksin örnekleri: küçük değişiklikler (örneğin AFB1 ve AFB2; veya OTA) toksisite ve yaygınlıkta önemli farklılıklara yol açabilir (Turner ve ark., 2015).	7
Şekil 2.2. AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2'nin kimyasal yapıları.	16
Şekil 2.3. Aflatoksin B1'in kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.4. AFM1 ve AFM2 mikotoksinlerin kimyasal yapıları.....	22
Şekil 2.5. Moleküler baskılamanın genel süreci.	29
Şekil 2.6. Moleküler baskılama sürecinin şematik gösterimi; (a) ön kompleks; (b) polimerizasyon; (c) kalıp molekülün uzaklaştırılması; (d) geri bağlanma	30
Şekil 2.7. MIP'lerin sentezinde kullanılan ajanlar; MMA: metil metakrilat; EGDMA: etilen dimetakrilat; AIBN: azobis(izobutironitril) ; DMF: dimetilformamid.....	31
Şekil 2.8. Yüzey plazmon rezonans uyarımının şematik deneysel kurulumu. Altın kaplamalı bir sensör çipi yarımküre (veya prizma) üzerine yerleştirilir. Polarize ışık, sensör çipinde ışık kaynağından (yıldız) parlar. Yansıtılan ışık yoğunluğu dedektörde (disk) ölçülür. Belli bir geliş açısında (ϕ), yüzey plazmonlarının uyarılması, yansıyan ışığın (A) yoğunluğunda bir düşüşe yol açar. Altın filmin yüzeyindeki kırılma indeksinin değişimi (A'dan B'ye) bir açığı kaymasına neden olacaktır.....	34
Şekil 2.9. Bir sensorgram: bağlanma (immersion) işleminin zamana göre izlendiği açığı	35
Şekil 2.10. Etketsiz (doğrudan) algılamanın şematik gösterimi: Analit, sensör yüzeyi üzerinde immobilize edilmiş ligandlar tarafından yakalanır. Analitin birikmesi, SPR tarafından tayin edilen evanesans (azalan dalga) alanında bir kırılma indisi değişikliğine neden olur. Burada ligand bir hidrojel içine immobilize edilmiştir. .	36
Şekil 2.11. Bir analiz döngüsünün aşamalarını gösteren sensorgram; (1) Tampon çözelti sensörle (baseline) temas etmektedir; (2) Numune çözeltisinin sürekli enjeksiyonu (birleştirme fazı): Sistem tampon çözeltisi RI analit çözeltisi RI'sinden farklı olduğunda bir kırılma indisi (RI) yığılması meydana gelir; (3) Tampon çözelti enjeksiyonu (elüsyon fazı); DR, bağlı hedef bileşik nedeniyle ölçülen yanıtı göstermektedir; (4) Rejenerasyon çözeltisinin enjeksiyonu (rejenerasyon adımı)	

sırasında bağılı türlerin yüzeyden uzaklaştırılması ve ardından yeni bir analiz döngüsü.....	37
Şekil 2.12. Metal nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin şematik gösterimi ve algılama alanlarındaki uygulamaları.....	40
Şekil 2.13. (a) Küresel bir nanopartikül üzerinde yüzey plazmon rezonans uyarımı; (b) Farklı şekil ve boyutlarda AuNP'lerin UV-vis-NIR spektrumları (Qiu ve Wei, 2014).....	41
Şekil 3.1. (a) Yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör sistemi; ve (b) SPR çip.	45
Şekil 3.2. SPR çip yüzeyinin allil merkaptan çözeltisi ile allil modifikasyonunun şematik gösterimi.....	47
Şekil 3.3. Aflatoksin B1 baskılanmış çiplerin tasarımının şematik diyagramı.....	48
Şekil 3.4. Aflatoksin M1 baskılanmış çiplerin tasarımının şematik diyagramı.....	48
Şekil 3.5. (a) Temas açısı ölçümleri için kullanılan KRÜSS DSA100 cihazı; (b) iğne.	50
Şekil 3.6. Düzgün homojen katı bir yüzeye sessile drop sıvı ile oluşan temas açılarının şematik gösterimi.....	51
Şekil 3.7. Elipsometre cihazı.....	53
Şekil 3.8. Süt örneği görüntüsü.....	55
Şekil 3.9. Taze fıstık örneklerinin görüntüleri; (a) taze fıstık; (b) fıstık örnekleri; (c) öğütülmüş fıstık; (d) santrifüj edilen fıstık örnekleri.....	56
Şekil 3.10. Mısır örneklerinin görüntüleri; (a) öğütülmüş mısır; (b) santrifüj edilen mısır örneği.....	57
Şekil 4.1. AuNP'lerin zeta boyut analizi sonuçları.....	64
Şekil 4.2. AuNP'lerin TEM karakterizasyon görüntüleri.....	65
Şekil 4.3. MAPA monomerinin ¹ H NMR spektrumu.....	66
Şekil 4.4. (a) AFB1 baskılanmış; (b) AFM1 baskılanmış SPR çiplerine ait FTIR-ATR spektrum sonuçları.....	67
Şekil 4.5. SPR çiplerin AFM görüntüsü: (a) boş çip; (b) allil modifikasyonu; (c) NIP; (d) AFM1 baskılanmış; (e) AFB1 baskılanmış çip.....	69
Şekil 4.6. SPR nanosensör çip temas açısı görüntüleri: (a) modifiye edilmemiş; (b) allil modifikasyonu; (c) NIP; (d) AFM1 baskılanmış; (e) AFB1 baskılanmış.....	70
Şekil 4.7. SEM cihazı kullanılarak altın yüzey üzerindeki immobilizasyon işleminin Karakterizasyonu; (a) modifiye edilmemiş çip enine kesit görüntüsü; (b) AFB1	

baskılanmış çip enine kesit (c) AFB1 baskılanmış çip yüzeyin görüntüsü; (d) AFM1 baskılanmış enine kesit ve çip yüzeyin görüntüsü.....	72
Şekil 4.8. SPR nanosensor çip elipsometre görüntüleri: (a) modifiye edilmemiş çip; (b) allil modifikasyonu; (c) baskılanmamış; (d) AFM1 baskılanmış; (e) AFB1 baskılanmış çip.....	75
Şekil 4.9. AFB1 baskılanmış SPR nanosensör ile AFB1 çözeltileri arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar; 0 ng.mL ⁻¹ -10 ng.mL ⁻¹ geniş derişim aralığında alınan sinyallerin karşılaştırılması.....	76
Şekil 4.10. AFB1-baskılanmış SPR nanosensor kinetik parametreleri; AFB1 derişimine bağlı kalibrasyon grafiği.....	77
Şekil 4.11. AFM1 baskılanmış SPR nanosensör ile AFM1 çözeltileri arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar; 0 ng.mL ⁻¹ -10 ng.mL ⁻¹ geniş derişim aralığında alınan sinyallerin karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.12. AFM1-baskılanmış SPR nanosensor kinetik parametreleri; AFM1 derişimine bağlı kalibrasyon grafiği.....	78
Şekil 4.13. Gıdalarda eş zamanlı ve doğrudan AFB1 tayini; (a) Fıstık örnekleri; (b) Mısır örnekleri.....	79
Şekil 4.14. Çiğ sütte eş zamanlı ve doğrudan AFM1 tayini; 0-10.0 ng.mL ⁻¹ derişim aralığında alınan sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.15. Baskılanmamış nanosensörün seçicilik sonuçları; 1.0 ng.mL ⁻¹ derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.....	81
Şekil 4.16. AFB1 baskılanmış nanosensörün seçicilik sonuçları; 1.0 ng.mL ⁻¹ derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.....	82
Şekil 4.17. AFM1 baskılanmış nanosensörün seçicilik sonuçları; 1.0 ng.mL ⁻¹ derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.18. (a) AFB1 baskılanmış nanosensörün seçicilik sonuçları; 0.1 ng.mL ⁻¹ derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması; (b) AFM1 baskılanmış nanosensörün seçicilik sonuçları; 0.1 ng.mL ⁻¹ derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.....	84
Şekil 4.19. (a) AFB1 baskılanmış ve (b) AFM1 baskılanmış çiplerin tekrarlanabilirlik sonuçları.....	85
Şekil 4.20. Aflatoksin baskılanmış SPR çiplerin raf ömrü sonuçları: (a) AFB1 baskılanmış; (b) AFM1 baskılanmış.....	86

Şekil 4.21. AFB1 baskılanmış nanosensör kinetik hız parametrelerinin belirlenmesi için matematiksel yaklaşımlar; (a) Denge kinetik (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik analizi.....	87
Şekil 4.22. AFM1 baskılanmış nanosensör kinetik hız parametrelerinin belirlenmesi için matematiksel yaklaşımlar; (a) Denge kinetik (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik analizi.....	88
Şekil 4.23. AFB1 baskılanmış nanosensör adsorpsiyon izoterm modelleri; (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mikotoksinleri üreten mantarların gelişebildiği ortamlara göre sınıflandırılması (Girgin, Başaran, & Şahin 2001).	6
Çizelge 2.2. Mikotoksinlerin neden oldukları çeşitli etkileri ve hastalıkları.	8
Çizelge 2.3. Mikotoksin kontaminasyonu ile insanlarda ve hayvanlarda görülen belirtiler ve etkiler.	9
Çizelge 2.4. Mikotoksinler için Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC, 2002) sınıflandırması (Vidal ve ark., 2018).	10
Çizelge 2.5. İlk olarak Hartley, Nesbitt ve O’Kelly tarafından belirlenen aflatoksinlerin temel fizikokimyasal özellikleri (Hartley, Nesbitt, O’Kelly, 1963; Benkerroum, 2019).....	18
Çizelge 2.6. Gıdalarda AFB1 maksimum izin verilen limitler.	20
Çizelge 2.7. Başlıca mikotoksinlerin gıda ve hayvan yemi seviyelerinde FDA ve EU maksimum limitleri (Alshannaq & Yu, 2017).	23
Çizelge 2.8. SPR biyosensör uygulama alanları.	34
Çizelge 2.9. Altın nanopartikül temelli sensörler.	42
Çizelge 4.1. SPR çiplerin temas açısı sonuçları.	71
Çizelge 4.2. AFB1 baskılanmış SPR sensörün seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları.	82
Çizelge 4.3. AFM1 baskılanmış SPR sensörün seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları.	83
Çizelge 4.4. AFB1-MIP SPR nanosensörün kinetik hız sabitleri verileri.	88
Çizelge 4.5. AFM1-MIP SPR nanosensörün kinetik hız sabitleri verileri.	89
Çizelge 4.6. İzoterm parametreleri; AFB1 baskılanmış SPR nanosensör.	91
Çizelge 4.7. İzoterm parametreleri; AFM1 baskılanmış SPR nanosensör.	91
Çizelge 4.8. Aflatoksin B1'in belirlenmesi için SPR ve HPLC yöntemleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması.	94
Çizelge 4.9. Aflatoksin M1'in belirlenmesi için SPR ve HPLC yöntemleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması.	94
Çizelge 4.10. Moleküler baskılama temelli aflatoksin sensörler.	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Au	Altın
Ag	Gümüş
K_d	Ayrışma sabiti
K_a	Bağlanma sabiti
C_e	Denge analit
q_e	Analitin miktarı
b	Adsorpsiyon denge sabiti
Q_0	Teorik tek tabakalı kapasite
K_F	Adsorpsiyon kapasitesi
n	Adsorpsiyon yoğunluğu Freundlich sabiti
θ_Y	Young temas açısı

Kısaltmalar

AF	Aflatoksin
AFS	Aflatoksinler
AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
AFM1	Aflatoksin M1
AFM2	Aflatoksin M2
DON	Deoxynivalenol

ZEA	Zearalenone
FB1	Fumonisin B1
OTA	Okratoksin A
CIT	Sitrinin
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
HEMA	2-Hidroksietil Metakrilat
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
NIP	Baskılanmamış (Non-imprinted) Polimer
AUNPS	Altın Nanopartiküller
LOD	Tayin sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
MAPA	N-Metakriloil-L-Fenilalanin
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
SERS	Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Saçılması
LSP	Lokal Yüzey Plazmonu
FTIR	Fouirer Transform Infrared Spektroskopisi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
TLC	İncetabaka Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
MRL	Maximum Residue Level (Maksimum Kalıntı Seviyesi)
NM	Nanometre
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
HAC	Asetik asit

1. GİRİŞ

Mantarlar (küf) mikroorganizma dünyasında önemli bir yer alır. Bilim, endüstri ve teknolojiye faydaları olabilir. Bunun yanında, ipliksi (filamentous: lifli) mantarlar insanlar, hayvanlar ve mahsuller için potansiyel bir zarar olarak görülmektedir. Aslında, birçoğu fitopatogenik (bitkilerde hastalık yapan) ve/veya mikotoksijeniktir. Bunların oluşumu, bitkiler için toprak kaynaklı birçok hastalığa yol açar, böylece insanlar ve hayvanlar için kirlenmiş gıdaların tüketilmesi çeşitli gıda ve yem kaynaklı mikotoksikoza neden olmaktadır. Sonuç olarak bu ipliksi mantarlar sadece insan ve hayvan sağlığına değil aynı zamanda uluslararası ekonomiye de zarar vermektedir (Nguyen ve ark., 2017).

Küflerin ana hedefi tahıllar, hububat, meyveler ve sebzelerdir. Kirletici ana toksinler; deoksinivalenol (DON) (veya bazı bölgelerde nivalenol), fumonisinler, zearalenon (ZEA), aflatoksinler (AFs) ve okratoksin A'dır (OTA) (Miller, 2008). Bunlar *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen en önemli mikotoksinlerdir (Pitt, 2000). Tahıllar, tüm hayvan yemi kaynaklarının yanı sıra dünya için temel gıda maddesidir (von Braun, 2007). Bu nedenle, mahsulleri küflerden ve mikotoksinlerinden korumak için araştırmalar vazgeçilmez hale gelmiştir (Nguyen ve ark., 2017).

İnsan ve hayvan sağlığı için giderek artan endişe, birçok gıda ürününde izin verilen maksimum mikotoksin seviyelerini belirleyen Avrupa Topluluğu yönergeleri tarafından ifade edilmektedir. Bu nedenle, hammaddelerdeki ve işlenmiş ürünlerdeki mikotoksin seviyelerinin kesin olarak izlenmesi için ayrıntılı analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. Mikotoksin, mantar âleminin organizmaları tarafından üretilen toksik ikincil bir metabolittir. Mikotoksinler, hem hasattan önce bitkilerde (tarladan kirlenme) hem de hasattan sonra gıda ürünlerinde ve depolama sırasında gelişmektedir. Doğrudan kirlenmeye karşı en savunmasız yiyecekler başlıca tahıllar, yağlı tohumlar, kurutulmuş meyveler ve kurutulmuş sebzeler, baharatlar, kahve ve kakaodur (Pennacchio ve ark., 2014; Anantha-Iyengar ve ark., 2019).

Belirli nem ve sıcaklık koşulları altında genellikle hastalıklı veya küflü mahsullerde mikotoksinler arasında en bağlantılı grup Aflatoksinler; *Aspergillus* cinsinin *flavus*,

parasiticus ve *nomius* türlerine ait ürünleridir (Boonen ve ark., 2012). *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen Aflatoksin B1 (AFB1) oldukça toksik ve güçlü bir doğal kanserojendir. Aflatoksin M1 ve M2, aflatoksin B1 ve B2'nin hidroksillenmiş metabolitleridir ve kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlardan sağlanan süt veya süt ürünlerinde bulunurlar. Aflatoksinler mısır, yer fıstığı, pamuk tohumu, fındık, badem, incir, antep fıstığı, baharat, süt, peynir ve çeşitli yiyecek ve içeceklerde tayin edilirler (Marin ve ark., 2013; Castillo ve ark., 2015).

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) hedef molekül için tasarlanan sentetik reseptörlerdir (Belbruno, 2019). Doğal antibadi-antijen ve enzim-substrat gibi sistemlerin analoglarıdır. Bu nedenle üretim aşamasında hedef molekülü seçici olarak tanıması için “anahtar-kilit” mekanizması taklit edilir. MIP'ler biyolojik reseptörlerin spesifikliğini ve seçiciliğini, çevresel şartlar ve düşük maliyet açısından dayanıklılığının açık avantajlarını sunarlar. MIP'lerin üretimi için olağan yöntemler, fonksiyonel monomerlerin polimerizasyonunu ve bir kalıp molekül etrafında çapraz bağlayıcının polimerizasyonunu içermektedir, böylece analitin uzaklaştırılmasından sonra, kalıp moleküle tamamlayıcı fonksiyonel ve şekil tanıma bölgeleri kalır. MIP'lerin sentezinde farklı üretim metodları kullanılmıştır fakat tümü aynı basamakları takip eder; (i) kalıp veya hedef molekül ile kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanan fonksiyonel gruplar ile ön-kompleks oluşturulur (ii) kalıp molekül etrafında uygun monomer ve başlatıcılarla polimer sentezlenir (iii) kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır ve geri bağlanma için boşluklar (kavite) oluşturulur (iv) MIP'ler karmaşık örnek içerisinde kalıp molekül ile etkileştirilir ve boşluklara kalıp molekül seçici bir şekilde yerleşir. Son yıllarda, yüksek bir seçiciliğe sahip farklı matrislerdeki çeşitli analitlerin ayrılması ve/veya algılanmasında uygulama ile çeşitli moleküler baskılanmış polimerler geliştirilmiştir (S. Akgönüllü, Yavuz, & Denizli, 2017; Battal ve ark., 2018; Belbruno, 2019; Goyal, Bhakta, & Mishra, 2019).

Yaşam kalitesi tüm dünyada en önemli ve dikkat çeken bir konudur. Bu yaşam kalitesi hastalıkların kontrolü, ilaç geliştirme, çevre temizliği, gıda güvenliği ve yurt güvenliği gibi çeşitli faktörler tarafından sürdürülmektedir. Biyosensörler, bu araştırma alanlarında son gelişmeler ve ilerlemeler nedeniyle yaşam kalitesini iyileştirmede önemli bir rol oynamaktadır (Shankaran, Gobi, & Miura, 2007).

Bir sensör, maddenin varlığını veya miktarını ölçen ve yorumlanabilir bir sinyale dönüştüren bir cihazdır. Biyosensörler, biyolojik yanıtı bir sinyale dönüştürerek maddeleri analiz etmek ve tayin etmek için kullanılan algılayıcı sistemlerdir. Biyospesifik etkileşimleri doğrudan ve basit bir şekilde kimyasal etiketleme olmadan gerçek zamanlı olarak hassasiyetle ölçmek için yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli biyosensörler yaygın olarak kullanılmıştır (Park ve ark., 2014).

Yüzey plazmon rezonans (SPR) olarak adlandırılan optik temelli algılama işlemi nanopartiküller ve ince filmler şeklinde altın ve gümüş ile artırılan floresanın yoğunluğu ile tayin etme ve görüntüleme uygulamaları nedeniyle en kapsamlı araştırmalardandır. Bir yüzey plazmonu, ince bir metal katman veya nanopartiküllerin yüzeyi boyunca yayılan elektromanyetik bir dalgadır. Yüzey plazmonunun optik uyarılması, p-polarize; birleştirilmiş ışık demeti, bir cam-metal film-dielektrik arayüzünde toplam iç yansıma geçirdiği Kretschmann geometrisinde elde edilebilir. Rezonansın oluştuğu spesifik açı, metal yüzeye bitişik ortamdan kırılma indisindeki herhangi bir değişikliğe karşı çok hassastır (Esentürk ve ark., 2019; Koyun ve ark., 2019; Pennacchio ve ark., 2014).

Özellikle, antijen-antibadi etkileşimlerini izleyen SPR biyosensörleri, genellikle 1000 Da'dan küçük olan düşük moleküler ağırlıklara sahip olan mikotoksinler gibi küçük moleküller için de oldukça spesifiktir. Fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağ gibi çeşitli yöntemler, biyosensörlerin geliştirilmesi için algılama yüzeylerini immobilize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Park ve ark., 2014).

Son derece yüksek toksisiteleri ve kanserojen olmaları nedeniyle, gıda maddelerinde maksimum aflatoksin kalıntı seviyeleri kontrolü birçok ülke tarafından yürütülmektedir. Sunulan tez çalışmasında, AFB1 ve AFM1'in gıdalarda seçici ve hassas tayini için moleküler baskılama temelli yüzey plazmon rezonans (SPR) nanosensörler hazırlanmıştır. Düşük molekül ağırlığına sahip mikotoksinler altın nanopartiküller ile konjuge edilmiş polimer filmin duyarlılığı artırılarak tayin edilmiştir. Poli(2-hidroksietil metakrilat) p(HEMA) temelli polimer filmde N-metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) fonksiyonel monomerler kullanılmıştır. Altın nanopartikül amplifikasyon stratejisinin etkinliği tartışılmıştır. SPR nanosensörde tarım ürünlerinde AFB1 ve çiğ sütteki AFM1'in ~8 dakika analiz süresiyle çok hassas bir şekilde tayini gerçekleştirilmiştir. AFB1 ve AFM1 için belirlenen tayin sınırı (LOD) değerleri sırasıyla 1.04 pg.mL^{-1} ve

0.4 pg.mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Tasarlanan aflatoksin sensörlerin tekrarlanabilirliği ve raf ömrü kararlılıkları incelenmiştir. Ayrıca, aflatoksin baskılanmış polimer nanofilm kaplı çiplerin homojenliğini belirlemek için Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modelleri kullanılarak adsorpsiyon modeli hesaplanmıştır. AFM1 ve AFB1 hedef moleküllerin nanofilm kaplı çiplerin üzerindeki adsorpsiyon davranışı Langmuir modeli ile uygun olarak bulunmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksin, Yunanca mantar anlamına gelen "mykes" ve Latince zehir anlamına gelen "toxicum" kelimelerinin bir birleşimidir (Piletska ve ark., 2010). Mikotoksinler, mikotoksikoz hastalığına sebep olan mantarlar tarafından üretilen toksinlerdir (Khalil, Gomaa, & Sebaei, 2013). Başlıca beş mantar türü, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Claviceps* tarafından ikincil (sekonder) metabolizma sonucu üretilen düşük molekül ağırlıklı (0.3-0.7 kDa) zehirli kimyasal ürünlerdir. Tarlada ya da hasattan sonra mahsulleri kolayca kolonize eden bu mantarlar, bu ürünlerden hazırlanan gıda maddelerinin alınması yoluyla insan ve hayvan sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Her bir mikotoksin bir veya daha fazla spesifik mantar türü tarafından üretilmektedir. En önemli mikotoksinler; *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* mantarları tarafından üretilen bir grup olan Aflatoksinler (AFs) ve bazı *Aspergillus* türleri (*Aspergillus ochraceus*) ve *Penicillium verrucosum* tarafından üretilen bir grup olan okratoksinlerdir (OTs) (Moss, 1992; Pitt ve ark., 2000; Piletska ve ark., 2010; Khaneghah ve ark., 2019). Aflatoxins (AFs), deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZEA), fumonisin B1 (FB1), okratoksin A (OTA) and sitrinin (CIT) gibi çeşitli türlerde mikotoksinler üreten bu mantarların neredeyse tamamı insanlar için zehirlidir (Arévalo ve ark., 2011; Guo ve ark., 2015). Kimyasal ve etkinlik yönünden farklı olan mikotoksinler, üreten mantarın gelişebildiği ortamlara göre sınıflandırılabilir ve bu sınıflandırma Çizelge 2.1’de görülmektedir.

Genellikle, *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri kurutma ve depolama koşulları sırasında gıdalar ve yemlerde oluşmaktadır. Mahsullerin enfeksiyonu *Aspergillus* türleri tarlada, büyüme mevsimi boyunca da meydana gelebilirken, *Fusarium* türleri, hasattan önce veya sonra, büyüyen bitkilerde (mısır, buğday ve arpa) mikotoksinler üreten zararlı bitki patojenlerini temsil etmektedir. Mikotoksinlerin çoğu sitotoksiktir, hücre zarlarının parçalanmasına neden olur, DNA (deoksiribonükleik asit), RNA (ribonükleik asit) ve protein sentezini önler veya etkiler bu da gıda güvenliği için önemli riskler oluşturmaktadır. Genellikle, hücrede ribozomlarda protein sentezinin inhibisyonu ile etki ederler, bu nedenle hücre bölünmesi de inhibe edilir (Gurban ve ark., 2017).

Çizelge 2.1. Mikotoksinleri üreten mantarların gelişebildiği ortamlara göre sınıflandırılması (Girgin, Başaran, & Şahin 2001).

A. Bitki Enfekte Edenler

Aspergillus flavus, Claviceps purpurea, Rhizoctonia leguminicola, Sclerotinia sclerotiorum, Fusarium graminearum (Gibberella zeae), Helminthosporium biseptatum

B. Depolanmış Ürünü Enfekte Edenler

Aspergillus flavus, A.parasiticus A.ochraceus A.clavatus A.fumigatus A.rubrum, A.chevalieri, A.chevalieri; P.urticae, P.verruculosum, P.puberulum, P.expansum, P.rugulosum, P.palitanis

C. Çürüyen Organik Maddeyi Enfekte Edenler

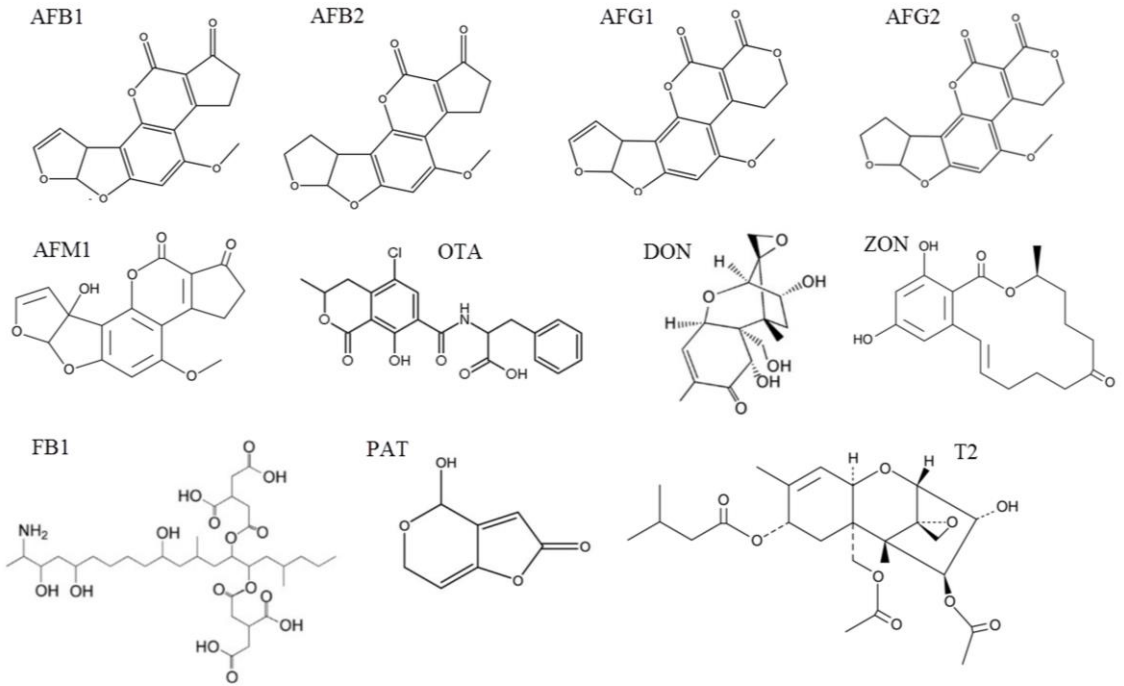
Pithomyces chartarum, Stachybotrys atra, Periconia minutissima, Fusarium sporotrichoides, Cladosporium spp, Alternaria longipes Fusarium graminearum, Chaetomium globosum, Dendrodochium toxicum, Myrothecium verrucaria, Trichothecium roseum, Trichoderma viride

Mikotoksinler, tahıllar, yağlı tohumlar, meyveler gibi tüketildiklerinde insan sağlığı üzerinde istenmeyen bir etkisi olan organik maddeler üzerinde yetişen mantarlar tarafından üretilen farklı kimyasal bileşimleri temsil etmektedir. Bazı mikotoksinler oldukça nadir bulunurken, aflatoksin (özellikle Aflatoksin B1) veya okratoksin (özellikle Okratoksin A) gibi diğerleri oldukça yaygındır (Adányi ve ark., 2007). Bu toksinlerle kontaminasyon, iyi tarım, depolama ve işleme koşulları uygulandığında bile, hala kaçınılmaz ve öngörülemez olarak kabul edilmektedir. Bitkilerin, yiyeceklerin ve yemlerin mikotoksinlerle kirlenmesini önlemek için farklı stratejiler ele alınmaktadır (Gurban ve ark., 2017).

Çoğu zaman, insanların mikotoksinlere maruz kalması dermal temas, inhalasyon ve yutma ile gerçekleşmektedir. Mikotoksin alımı, kontamine yiyecekler yiyerek, doğrudan tahıllar yoluyla veya dolaylı olarak hayvansal ürünler (örn. yumurta, süt ve et) yoluyla meydana gelebilir. Birçok mikotoksin, ısıtma (pişirme, kaynatma), fiziksel (sterilizasyon, soğutma, dehidrasyon, kuruma, liyofilizasyon ve ışınlama) ve kimyasal işlemlere (çözücülerle ekstraksiyon, oksidasyon, hidroksilasyon vb. ile moleküler yapının modifikasyonu) endüstriyel gıda işlemeye karşı büyük ölçüde dayanıklıdır. İşlemeye karşı olan bu direnci ve dayanıklılığı nedeniyle, tüm gıda maddelerinde

bulunabilirler, miktarları sadece işleme ile azaltılabilir ancak tamamen ortadan kaldırılamaz (Bennett ve Klich, 2003; Marin ve ark., 2013; Chen ve ark., 2015).

Mikotoksin gıda ve yem kontaminasyonu insan sağlığı üzerindeki toksik etkilere neden olduğundan dolayı küresel endişe sebebi olmuştur (Sharma ve ark., 2016). Mikotoksin tanıma alanında analitik döngüde çoklu analitlerin eş-zamanlı izlenmesi, belirlenmesi ve bu tür yöntemlerin geliştirilmesi çok önemlidir. Mikotoksinler, farklı tiplerde yiyecek ve yemlerde bulunur ve varlıkları çeşitli aşamalarda kontrol edilmelidir: hasattan önce ve sonra, işlemde önce ve sonra gibi. Bazı mikotoksinler gıda maddelerinde eş-zamanlı olarak bulunabilir, bu nedenle çoklu mikotoksin analizlerinin uygulanması, test miktarını azaltmaya ve dolayısıyla yiyecek ve yem kalite kontrolü için maliyetleri ve zamanı düşürmeye yöneliktir. Son zamanlarda çoklu mikotoksin tayini için bazı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir (Goryacheva ve ark., 2007).



Şekil 2.1. Yapı ve işlevsellik çeşitliliğini gösteren yaygın mikotoksin örnekleri: küçük değişiklikler (örneğin AFB1 ve AFB2; veya OTA) toksisite ve yaygınlıkta önemli farklılıklara yol açabilir (Turner ve ark., 2015).

Şekil 2.1’de görüldüğü gibi çoğu mikotoksin kimyasal ve yapısal olarak farklıdır. İkincil metabolitlerin çoğu, küçük moleküllerden (asetatlar, piruvatlar, vb.) basit biyosentetik reaksiyonlarla sentezlendiğinden, bu durum oldukça şaşırtıcıdır, ancak bu,

Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi hem akut hem de kronik olan çok çeşitli toksik etkilere sahip bileşiklerin oluşumuna yol açmaktadır (Turner ve ark., 2015).

Çizelge 2.2. Mikotoksinlerin neden oldukları çeşitli etkileri ve hastalıkları.

Mikotoksin	Tür	Etkileri
Aflatoxin B1	<i>Aspergillus</i>	Karsinojen, teratojenik
Okratoksin A	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>	Kanserojen, nefrotoksik, hepatotoksik, teratojenik
Patulin	<i>Penicillium</i>	Akciğer ve beyin kanaması
Fumonisin B1	<i>Fusarium</i>	Kanserojen hepatotoksik
Penitrem A	<i>Penicillium</i>	Nörotoksisite
Zearalenon	<i>Fusarium</i>	Östrojenik aktivite
Trikotesenler (T-2 toksin)	<i>Fusarium</i>	Dermatoksisite Hematopoetik etki
Sporidesmin A	<i>Pithomyces</i>	Nörotoksisite
Fomopsin A	<i>Phomopsis</i>	Hepatotoksisite
Sitrinin	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	Nefrotoksik
α -Siklopiyazonik asit	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	Nörotoksisite
Ergotoksinler (ergotamin)	<i>Claviceps</i>	Vazokonstrüksiyon Nörotoksisite

Mikotoksinler, insanlar ve hayvanlar için olumsuz sağlık etkileri (kanserojen, teratojenik, mutajenik, nefrotoksisite, hepatotoksisite ve immünotoksisite) indükleyebilen toplam moleküler ağırlığı 500 Da'dan az olan nispeten küçük moleküllerdir. Mikotoksinlerin belirli bir türün sağlığı üzerindeki etkisi maruz kalma miktarına ve süresine, yaş, kilo, cinsiyet, diyet ve diğer mikotoksinlerin varlığına bağlıdır (Milićević, Škrinjar, & Baltić, 2010; Zain, 2011). Mikotoksinlerin çoğu dört tip toksisiteye neden olabilir: kronik, kanserojen, mutajenik ve teratojeniktir. Çoğu zaman, mikotoksin kontaminasyonunun tanımlanan etkileri, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının etkilenmesidir. Bazıları nörotoksik etkilere sahiptir, küçük miktarlardaki varlıkları hayvanlarda titremeye neden olabileceği gözlenirken, yüksek miktarlar beyin hasarına ve hatta ölüme neden olabilir. Düşük dozlarda mikotoksinlere uzun süre maruz kalınması, özellikle karaciğer ve böbrekte kansere neden olabileceği

gösterilmiştir (Stoloff, 1983). Çizelge 2.3 mikotoksin kontaminasyonu nedeniyle insanlar ve hayvanlar üzerinde gözlemlenen etkileri özetlemektedir (Gurban ve ark., 2017).

Çizelge 2.3. Mikotoksin kontaminasyonu ile insanlarda ve hayvanlarda görülen belirtiler ve etkiler.

Sistem	Vasküler	Sindirim	Solunum	Sinir	Cilt	Üreme ve boşaltım
Semptom& Etkileri	Kan damarlarının kırılabilirliğinin artması	Kusma Bağırsak kanaması	Nefes darlığı	Titreme/ Koordinasyon eksikliği	Tahriş	Kısırlık
	Mukoza ve akciğerlere iç kanama	Karaciğer nekrozu	Akciğerlerin kanaması	Depresyon	Yanma hissi	Nefrotoksisite
		Mukoza membran tahribatı		Baş ağrısı	Foto-duyarlılık	

Kalorik (ısı) yoksunluk, vitamin eksikliği, alkol aşırılığı ve bulaşıcı hastalıkların durumu gibi bir dizi faktör, insanlarda mikotoksin kontaminasyonunun şiddetini güçlü bir şekilde etkilemektedir (Bennett ve Klich, 2003).

Günümüzde, mikotoksinler adı verilen 300'den fazla madde vardır, ancak bunları sadece tanımlamak zor değil, aynı zamanda sınıflandırmakta zordur. Genellikle, sınıflandırma kriterleri bunu yapan kişinin uzmanlık alanına göredir. Örneğin, kimyagerler onları kimyasal yapılarına göre (örn., kumarinler, laktonlar vb.), Biyokimyacılar biyosentetik kökenlerine göre, klinisyenler etkilenen organa göre (hepatotoksinler, nefrotoksinler, nörotoksinler ve immünotoksinler), mikologlar onları üreten mantarlara göre (örn., *Aspergillus* toksinleri, *Penicillium* toksinleri vb.) sınıfladırlar ve ayrıca hücre biyologları bunları dört genel grupta sınıflandırır: kanserojenler, teratojenler, mutajenler ve alerjenler (Pitt, 2000; Bennett ve Klich, 2003). Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC), mikotoksinlerin insanlar için kanserojen veya potansiyel olarak kanserojen olarak sınıflandırılması için dört grup tanımlamıştır. Çizelge 2.4.'de mikotoksinler için yapılan sınıflandırma sunulmaktadır.

Çizelge 2.4. Mikotoksinler için Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC, 2002) sınıflandırması (Vidal ve ark., 2018).

Grup	Sınıflandırılması	Mikotoksinler
1	insanlar için kanserojen	Aflatoksinler
2A	muhtemelen insanlar için kanserojen (insanlar için sınırlı bulgu ancak hayvanlarda yeterli)	-
2B	muhtemelen insanlar için kanserojen (insanlar için sınırlı bulgu ancak hayvanlarda yeterli)	Sterigmatocystin, fumonisinler ve ochratoxin A
3	insanlar için kanserojenlik açısından sınıflandırılmaz	Deoksinivalenol, nivalenol, T-2 toksin, diasetoksikripenol, zearalenon, sitrinin ve fusarenon X
4	muhtemelen insanlar için kanserojen değildir	-

Aflatoksinler, fumonisin, okratoksin A, deoksinivalenol, patulin, zearalenon, trikotesenler ve ergotamine, insan sağlığını ve ekonomiyi güçlü bir şekilde etkileyen, en yaygın kirleticiler oldukları düşünülmektedir. Her yıl, dünya çapında hasat edilen mahsullerin yaklaşık %25'inin mikotoksinlerle kirletildiği ve önemli ekonomik kayıplara yol açtığı tahmin edilmektedir. Bu kirleticilerin dikkatle izlenmesi gerekir, bu nedenle, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile bilimsel danışma kurulları mikotoksinle ilişkili kirliliğin değerlendirilmesinden sorumludur (Bennett ve Klich, 2003; Gurban ve ark., 2017).

2.2. Fitopatojenik ve Mikotoksijenik Mantarlar

2.2.1. *Fusarium* Türleri

Fusarium, *Sordariomycetes* sınıfına ve *Nectriaceae* familyasına ait büyük bir asklı (ascomycete) mantar grubudur. *Fusarium*, en önemli fitopatojenik gruplardan biridir (Dennis ve Booth, 1972). *Fusarium* oluşumu her türlü bitki dokusunda, birçok tahıl ürünlerinde ve topraklarında bulunabilir. Patojenik *Fusarium* tarafından en çok etkilenenler tahıl, mısır, arpa, sorgum (süpürge darısı) ve yulaftır. Bu kirlenmelerden sorumlu *Fusarium* türleri *Fusarium graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. avenaceum*, *F. accuminatum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *F. langsethiae*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. paranaense*, *F. anthophilum*, ve *F. graminearum*

bulaşmada en sık görülen türlerdir. *Fusarium* patojenleri ayrıca çeşitli sebze ve meyvelerde; soya fasulyesi, biber ve domatesde de bulunur. *Fusarium spp.* çok çeşitli mahsullerde hasara neden olan toprak kaynaklı ve tohum kaynaklı patojenlerdir ve çeşitli hastalıklardan sorumludurlar. Tahıl ürünlerinde en sık görülen hastalıklar, çok büyük verim kaybına ve mahsul kalitesinin düşmesine yol açabilen *Fusarium* Head Blight -FHB'dir (Nguyen ve ark., 2017). *Fusarium spp.* birçok bitkide çürük hastalığına neden olan ajanlardır: soya kök çürüklüğü (Arias, Leandro, & Munkvold, 2013; Chang ve ark., 2015), mısır kök çürüklüğü (Kaur ve ark., 2014), salatalık kök ve buhar çürüklüğü (Pavlou ve Vakalounakis, 2005). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerum* J.H. Owen, salatalıkta en ciddi hastalıklardan biri olarak rapor edilen *Fusarium* solgunluğuna neden olmuştur (Qiu ve ark., 2012). *Fusarium oxysporum*'da muz (Ploetz, 2006) ve kavunda (Ma ve ark., 2014; Cohen ve ark., 2015) solgunluğa neden olmuştur. *F. oxysporum* f. sp. *citri* olarak tanımlanan yeni bir toprak kaynaklı patojen soyu, turunçgil ağaç fidelerinin hastalıklarına neden olmuştur (Hannachi ve ark., 2015). Verim kaybı ve hastalıkların ciddiyeti *Fusarium* enfeksiyonunun derecesi ile bağlantılıdır (Chang ve ark., 2015). *Fusarium* enfeksiyonları hem insanlarda hem de hayvanlarda rapor edilmiştir (Antonissen ve ark., 2014; Nguyen ve ark., 2017).

Fusarium türlerinin çoğunluğu mikotoksin üretebilir. İnsan ve hayvan zehirlenmelerine yol açan gıdalarda ve yemlerde toksinlerin birikmesinde rol oynarlar. *Fusarium sp.* tarafından üretilen bu mikotoksinlere fusariotoksinler denir ve akut ve/veya kronik toksisiteleri ile karakterize edilirler. Üç fusariotoksin grubu vardır: trikotesenler, zearalenone ve fumonisinler. Bazı türler aynı zamanda *Fusarium* cinsi trichothecenes üreten en tehlikeli (öldürücü) olarak kabul edilen *F. graminearum* gibi aynı anda birkaç mikotoksin üretebilir. *F. graminearum* ayrıca daha az veya daha fazla toksik olan sambucinol, dihidroksikalkonektrin, butenolid ve fusarin C gibi diğer zearalenon ve culmorin ikincil metabolitleri üretebilir (Lysøe ve ark., 2006).

2.2.1.1. Trikotesenler

Trikotesenler, çeşitli *Fusarium* türleri tarafından üretilen bir grup mikotoksindir. Bu grup 4 tipi olan A, B, C ve D olarak sınıflandırılmıştır ve 200'den fazla kimyasal türev içermektedir; 2 tipi olan A ve B çoğunlukla *Fusarium spp.* tarafından üretilir ve doğada yaygın olarak bulunur. Ekinlerdeki baskın trikotesenler deoksinivalon (DON) ve

türevleri, nivalenol, T-2 ve HT-2 toksini ve diasetoksikripenol (DAS) başlıca *F. sporotrichioides*, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. asiaticum*, *F. crookwellense*, *F. Langsethiae*, *F. equiseti* ve *F. Accuminatum* tarafından üretilmiştir (Golinski ve ark., 1988; Bottalico ve Perrone, 2002; H. Zhang ve ark., 2010; Gale ve ark., 2011).

Trikotosenler un, makarna ve diğer tahıllar gibi deoksinivalon'un (DON) en çok bulunduğu başlıca mısır ve buğday temelli gıda ürünlerinde görülmektedir. DON buğday örneklerinde Çin'de %85-90'ında 500-15 000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ oranında (Li ve ark., 2013) ve Kanada'da 4700 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ kadar bulunduğu rapor edilmiştir (Tittlemier ve ark., 2013). Çek maltlık arpalarda T-2 ve HT-2 toksinleri gibi diğer trikotoksinler ile 2213.5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ DON bulunmuştur (Běláková ve ark., 2014). Ayrıca yulafta 3-asetildeoksinivalenol (3-AcDON) ve 15-asetildeoksinivalenol (15-AcDON) olarak asetillenmiş türevleri olan T-2, HT-2, DAS ve DON (127 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) dahil trikotosenler saptanmıştır (Kiecana ve ark., 2012). Trikotosenler su hassasiyetinde tahılların büyümesini azaltır ve mikotoksinlerin birikmesi mahsul üretiminin kalitesini ve verimini azaltır (Oliveira ve ark., 2012). Toksin seviyeleri patojen oluşumu ile pozitif ilişki gösterir (Lindblad ve ark., 2013). Mikotoksinler, bu toksik moleküllerle kontamine olan mahsullerin tüketimi yoluyla insanlara ve hayvanlara kolayca transfer edilebilir. Daha sonra, hem akut hem de kronik zehirlenmelere maruz kalmaya neden olurlar (Cortinovis, Battini, & Caloni, 2012). DON domuz ve kümes hayvanlarında kilo alımının bozulma, kusma, yem reddi ve beslenme verimliğinde azalmasından sorumludur. DON'un domuzlarda (Tittlemier ve ark., 2013), tavuklarda (Ren ve ark., 2015) and insanlarda (Maresca ve ark., 2002) çeşitli immunolojik etkileri olduğu bildirilmiştir. Hindistan'da DON nedeniyle büyük çapta tarihsel bir insan toksikoz salgını rapor edilmiştir (Bhat ve ark., 1989). Bazen trikotosenler, aflatoksin veya zearalenon gibi diğer mikotoksinler ile kombinasyon bir toksisite sinerjik etki yaratabilir (Sun ve ark., 2015).

2.2.1.2. Zearalenon

Zearalenon mikoöstrojenik toksin olarak kabul edilir ve bir insan yumurtalık hormonuna benzediği için cinsel bir hormon gibi davranabilir. Böylece insandaki östrojenik reseptöre uyabilir. Bu toksin başlıca *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. equiseti* ve *F. crookwellense* tarafından üretilmektedir (Bottalico ve Perrone, 2002).

Ayrıca *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* ve *F. laterum* gibi diğer *Fusarium* türleri tarafından sentezlenmektedir. Bu toksin, mısır, yulaf, buğday ve arpada çeşitli derişimlerde sıklıkla tayin edilmektedir. Dahası zearalenonun genellikle DON, aflatoksin B1 ve okratoksin gibi diğer mikotoksinlerle birlikte ortaya çıktığı bulunmuştur. Bu nedenle, zearalenon tarafından bozulan tahılların tüketimi domuzlar, atlar, sığırlar ve Çelikbaş alabalığı gibi suda yaşayan ve evcil hayvanlarda genital ve doğurganlık sorunlarına neden olabilir. Zearalenonun aynı zamanda hepatotoksik olduğu bilinmektedir. Hepatik fonksiyonun azalması ile ilişkili hayvan karaciğerinde histolojik değişikliklere neden olmuştur (Marin ve ark., 2013; Gerez ve ark., 2015). Ek olarak, zearalenonun hematolojik parametreler üzerinde etkileri vardır ve genotoksik potansiyele sahiptir (Pietsch ve ark., 2015). Hayvanlar gibi insanlar bu fitoöstrojeni içeren gıda ürünlerinin tüketilmesinden de etkilenmektedir (Nguyen ve ark., 2017).

2.2.1.3. Fumonisinler

Fumonisinler, 1980'lerin sonunda keşfedilen ve karakterize edilen gıda kaynaklı mikotoksinlerdir (Bezuidenhout ve ark., 1988). Bu toksin ailesi, A, B, C ve P olmak üzere 4 ana grupta sınıflandırılmış farklı moleküllerden oluşmaktadır. Tahıllardaki en yaygın fumonisinler, fumonisin B1 (FB1), fumonisin B2 (FB2) ve fumonisin B3 (FB3) dahil fumonisin B'dir. FB1 toplam fumonisinlerin %70-80 oranında en bol olanıdır (Rheeder, Marasas, & Vismar, 2002). Fumonisinler, mısır temelli gıdalarda sıklıkla bulunmaktadır. Hindistan'da fumonisin kirlenme seviyesi mısırdaki 121.420 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ve sorgumda 20.320 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ olarak tespit edilmiş ve oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir (Sreenivasa ve ark., 2013). Fas'ta mısır gevreği gibi 68 işlenmiş kahvaltılık ürünün %24'ünde fumonisin bulunmuştur (Mahnine ve ark., 2012). Ayrıca FB1 mısırdaki 5960 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ derişime ulaştığı kaydedildi. (Zinedine ve ark., 2007), Arjantin'de sadece hasat edilmiş buğdayda 1304 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Cendoya ve ark., 2014) Sırbistanda budayda depolama sırasında 5400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ derişime ulaştığı kaydedilmiştir (Stanković ve ark., 2012). Bu çalışmalar ayrıca fumonisin B1'in DON, zearalenon ve okratoksin A gibi diğer fusariotoksinlerle birlikte ortaya çıktığında göstermiştir. Fumonisinler başlıca *F. proliferatum*, *Fusarium verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. anthophilum* ve *F. nygamai*, tarafından üretilmektedir (Nguyen ve ark., 2017). Fumonisinlerin insanlar üzerindeki en belirgin etkisi, Çin'de ve Güney Afrika bölgelerinde bildirilen mısırla ilişkili bir özofagus kanseriydi. Bu bölgelerin küflü mısırlardaki fumonisin seviyeleri 155.000

$\mu\text{g.kg}^{-1}$ FB'ye kadar önemli ölçüde yüksek olduğu belirtilmiştir (Chu ve Li, 1994). Bu nedenle, insanda kanser ve diğer hastalıklar için bir risk faktörü olduğundan şüphelenilmiştir (Nguyen ve ark., 2017).

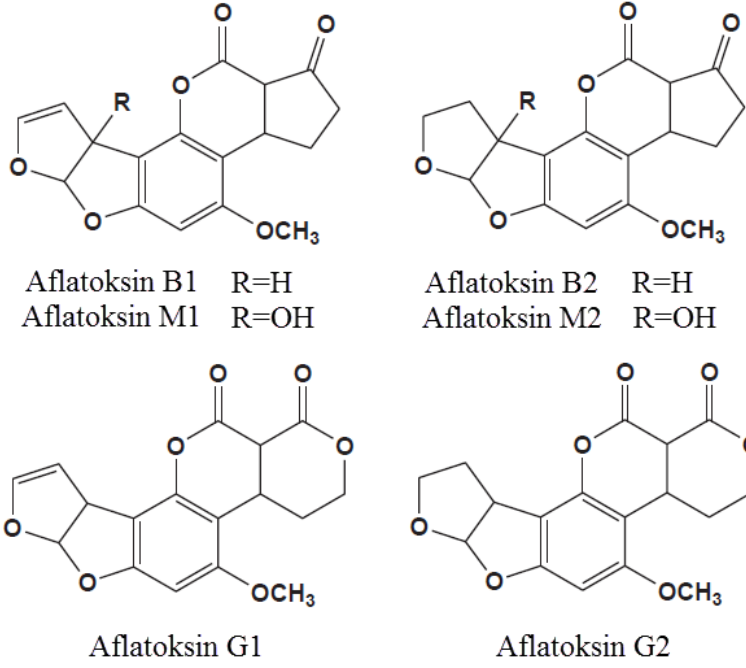
2.2.2. *Aspergillus* Türleri

Aspergillus türü, sadece aseksüel üremeli iplikli mantarlar (ascomycete) sınıfına aittir. *Aspergillus* suşları, ekosistemdeki önemli rolleri ve patojenliklerinden dolayı en çok çalışılan mantarlar arasında yer almıştır. Uygun koşullar altında bir substrat ile temas ettiğinde havada yayılabilen ve filizlenebilen çok miktarda spor üretirler (Baker ve Bennett, 2007). Saprofit (çürükçül) olarak işlev gören küflü saman, organik kompostlar, yaprak çöpü, bitki çöpü gibi ayrılmış malzemelerde, gübre gibi indirgen substratlarda, insan dokuları, toprakta ve havada veya tozda kolayca büyük miktarda bulunabilirler (Cvetnić ve Pepeljnjak, 1997). *Aspergillus* ayrıca çeşitli gıda ürünlerinde bulunur ve her türlü gıda maddesini bozabilir. Tahıllarda ve meyvelerde geniş ölçüde dağılırlar. Pirinç, buğday, mısır, arpa, sorgum (süpürge darısı), soya fasulyesi, yer fıstığı ve börülce de dahil olmak üzere çok çeşitli hububat, tahıllar ve fındıklar *Aspergillus spp.* ile kirlenmeye yatkındır (Petchkongkaew ve ark., 2008; Ruadrew, Craft, & Aidoo, 2013; Kange ve ark., 2015). Bazı kseroofilik (düşük su derişiminde büyüeyebilen) *Aspergillus* türleri baharatlarda ve kurutulmuş yiyeceklerde bulunabilir (Romero ve ark., 2005; Ruadrew ve ark., 2013). pH ve a_w 'nin (a_w ; water activity) düşük olduğu, ancak şeker veya tuz derişimi oldukça önemli olan, reçel veya tuzlanmış kurutulmuş balık gibi düşman ortamlarda (hostile environments) bile büyüeyebilirler. Ana türler *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. oryzae* olarak tanımlanmıştır ve bazıları bu ürünlerde potansiyel olarak mikotoksinler üretebilir. *A. carbonarius* dahil Nigri *Aspergillus* bölümü, üzüm ve şaraptaki birçok hastalık ve mikotoksin birikmesinden sorumludur (Serra ve ark., 2003; De Felice ve ark., 2008; Vitale ve ark., 2012). *Aspergillus*, Nijerya'da (Oyetunji, 2006) ve kakao çekirdeklerinde farklı kakao temelli içecek markalarında en çok rastlanan türlerdir (Sánchez-Hervás ve ark., 2008). Benzer şekilde kahvede, siyah *Aspergilli* ve bazı section Circumdati suşları kahve çekirdeği ve vişnelerde yüksek oranda görülmüştür (Taniwaki ve ark., 2003; Noonim ve ark., 2009). Kahve, pirinç, içecek ve diğer gıda maddelerinde potansiyel okratoksin A oluşumu ile ilgili olarak section Circumdati ana *Aspergillus* türleri *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* ve *A. steynii*'dir.

Biyoteknolojide ve gıda teknolojisinde pek çok faydası olmasına rağmen, *Aspergillus* türleri insan ve hayvanlarda kritik hastalıklar ile ilişkilidir. *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. awamori* ve *A. tubingensis* kulak kanalında otomikoza neden olan yaygın türlerdir (Szigeti ve ark., 2012). *A. fumigatus* akciğer mikozlara ve aşırı duyarlılık pnömonisine neden olur (Kosmidis ve Denning, 2015). Arpa ve mısırdaki *A. clavatus* ve *A. fumigatus* kontamine sporları çiftçilerin ve malt işçilerinin akciğerlerinde yüksek derişimde bulunurken, kompost (organik gübre) işçilerinin akciğerlerinde de *Aspergillus* sporları tarafından kolonize olduğu bulunmuştur. Havadaki mantar conidia (aseksüel spor), solunması veya gözler ve diğer vücut kısımları ile teması ile insanlara bulaşabilir ve böylece alerji ve astım gibi bazı hava yolu hastalıklarına neden olabilir. Ayrıca, birçok *Aspergillus* türünün insanlar, hayvanlar ve bitkiler için toksik metabolitler üretebileceği bilinmektedir. Bu mikotoksinler arasında aflatoksinler ve okratoksinler en problemli kimyasal bileşiklerdir (Nguyen ve ark., 2017).

2.2.3. Aflatoksinler

Aflatoksinler (AF) en önemli ve en çok çalışılan mikotoksinler olarak bilinmektedir. Aflatoksinler, çoğunlukla toprakta, bitkilerde ve çeşitli fındıklarda, özellikle yer fıstığı, mısır, pirinç, soya fasulyesi, buğday gibi tahıllarda bulunan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* mantar türleri tarafından üretilen yüksek derecede zehirli ikincil metabolitlerdir (Khangwiset, Shephard, & Wu, 2011). Yaklaşık olarak 18 aflatoksin türü tanımlanmıştır (Zhang ve ark., 2013). Özellikle *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. ochraceorocceus*, *A. bombycis*, *A. tamarisii* ve *A. pseudotamarisii* tarafından 4 temel türü olan AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 aflatoksin üretilmektedir (Pitt, 2000; Nguyen ve ark., 2017). Difurocoumarin türev bileşikleri olan B, G ve M ana metabolitler hepatokarsinogenik toksinlerdir. Farklı *Aspergillus* türleri, farklı türevler üretir. *Aspergillus flavus* sadece aflatoksin B, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* aflatoksin B ve aflatoksin G üretir. Aflatoksin B ve G kuru meyvelerde, baharatlarda ve mısır, yerfıstığı, fındık ve kurutulmuş hindistan cevizi (copra) gibi tahıllarda bulunur. Aflatoksin M1 ve M2, aflatoksin B1 ve B2'nin hidrosillenmiş metabolitleridir ve kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanlardan sağlanan süt veya süt ürünlerinde bulunabilir.



Şekil 2.2. AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2'nin kimyasal yapıları.

Mikotoksinler arasında, aflatoksinlerin toksik etkileri çok değişkendir. Aflatoksinler, bazı kişilerde hepatit B enfeksiyonu ile karaciğer kanseri ve artan kanserojen potansiyele neden olmaktadır. Bilinen en güçlü hepatokarsinojenlerdir (Anukul, Vangnai, & Mahakarnchandkul, 2013). Aflatoksinler ilk olarak 1960 yılında Birleşik Krallık'ta 100.000 hindinin ölümüne neden olan kirli (kontamine) hayvan yemlerinde tanımlanmıştır (Blount 1961; Ma ve ark., 2016). Bu salgın Turkey-X hastalığı olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, 1961'de Kenya, Uganda ve Batı Afrika'daki ördeklerde aflatoksin salgını meydana gelmiştir. Akut aflatoksikoz Kenya'da 123'ten fazla ölüme neden olmuştur. 1991'den 2009'a kadar Japonya'da, ithal edilen gıdalardaki aflatoksin B1'in bitki enfekte kaynaklardan 10-4918 mg.kg⁻¹ seviyesinde kirlenme konusunda 1500'den fazla ihlal vakası bildirilmiştir (Anukul ve ark., 2013).

Aflatoksinler birçok tahılda ve bunların türetilmiş ürünlerinde saptanabilir. 1998 yılında ABD'de mısırdaki *Aspergillus spp.*'nin şiddetli istilasından sonra gıda kalitesini düşürmüştür, 1998'den 2001'e kadar hasat edilmiş mısırdaki aflatoksin seviyelerinin ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar, neredeyse tüm numunelerin aflatoksin içerdiğini göstermiştir. Kirlenme seviyesi, AFB1 derişiminin 641 lg.kg⁻¹ olduğu 653 lg.kg⁻¹'a ulaştığı görülmüştür (Abbas ve ark., 2006). Kenya'daki sorgum (süpürge darısı) granüllerinde 4 ana aflatoksin türü tespit edilmiştir (taze hasat edilmiş ve depoda)

(Kange ve ark., 2015). Spagetti, erişte, makarna, lazanya ve bucatini gibi buğdaydan elde edilen ürünlerin AB yasal sınırının üzerindeki derişimlerde aflatoksinlerle kontamine olduğu görülmüştür. Sonuçlar, gıdaların kalite kontrolüne kesinlikle dikkat edilmesine yol açmıştır (Iqbal, Asi, Jinap, & Rashid, 2014). Aflatoksin kontaminasyonu ayrıca hayvanlarında ilgilendirmektedir. Aflatoxijenik *Aspergillus* türleri olan *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. tamarii* içeren Flavi, kanatlıların yemlerinden izole edilmiştir ve mısır tanelerinde 440.521 lg/kg seviyesine kadar olan aflatoksin üretebilmişlerdir (Ezekiel ve ark., 2014). Fındık, antep fıstığı, ceviz ve kuru üzüm, kuru incir gibi kuru meyvelerde aflatoksin görülme sıklığı da oldukça yüksektir (Arrus ve ark., 2005; Juan ve ark., 2008). Düşük bir oluşum olasılığına rağmen, *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius*, kakao çekirdeğinde aflatoksin B1, B2, G1 ve G2'yi sentezleyebilir. Böylece, bu toksinler, özellikle çocuklar tarafından yaygın olarak tüketilen kakao alt ürünlerinde yüksek oranda bulunmaktadır (Sánchez-Hervás ve ark., 2008; Copetti ve ark., 2011). Ayrıca, aflatoksin B1 ile kontamine olmuş yemlerin emziren hayvanlar tarafından tüketilmesi, ardından aflatoksin B1'in hayvan metabolizması ve sindirimi yoluyla M1'e dönüştürülmesi yoluyla aflatoksinler süt ürünlerinde bulunabilir (Bognanno ve ark., 2006; Vaz ve ark., 2020) Toksin teknolojik işleme dayanabilir ve aflatoksin M1 pastörize edilmiş ve Ultra-yüksek sıcaklıkta (UHT) işlenmiş sütlerde (Bilandžić ve ark., 2014; Zheng ve ark., 2013), süt tozunda (Marimón Sibaja ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2019), yoğurtta (Hamed ve ark., 2017; G. Zhang ve ark., 2019) ve peynirlerde (Janaína ve ark., 2019) bulunabilir.

Daha önceden aflatoksinlerin bulaştığı yem ve yiyecekler, özellikle immün sistemi baskılanmış (bağışıklık yetmezliği) olanlar için, hem akut hem de kronik zehirlenme nedeniyle insan ve hayvan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Aynı hastalıktan etkilenen 14.000 ördek yavrusunun ölümüne neden olmuştur. Aynı dönemde, ABD'de bir alabalık hepatom (karaciğer tümörü) patlaması rapor edilmiştir. Daha sonra elde edilen sonuçlar, hepsinin ortak nedeninin aflatoksinler olduğunu göstermiştir. Kuşlarda, bu mikotoksinlerin tüketilmesi yemeyi reddetme, uyuşukluk ve kanatların zayıflığı ile sonuçlanmıştır. Ardından kuşlar bir hafta içinde ölebilmektedir (Goldblatt, 2012; Nguyen ve ark., 2017). İnsanlar için aflatoksinler, hepatotoksik olarak kabul edilmektedir. Toksin karaciğere saldırır ve tümörleri ve teratojenik etkileri ve hatta hastaların ölümünü indüklemiştir. Aflatozikoz semptomları, ödem, karaciğer hemorajik nekrozu ve derin koma olarak tanımlanmıştır (Williams ve ark., 2004). Ayrıca aflatoksinler özellikle de aflatoksin B1 kanserojen olarak nitelendirilmiştir.

Aflatoksinler, Orta Afrika ve Güneydoğu Asya'da yüksek oranda insan karaciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Shank ve ark., 1972a; Shank, Wogan, & Gibson, 1972b; Kirk, Bah, & Montesano, 2006).

Tarım ürünlerinde en önemli mikotoksinlerden biri olan aflatoksinler, 1960'ların başındaki keşiflerinden bu yana çok fazla ilgi görmüştür (Kensler ve ark., 2011). Gıda ürünlerinde oluşabilirler ve insan sağlığına son derece zararlıdır. Gıda güvenliği sorunu aflatoksin tayini için son derece hassas ve seçici yöntemlerin geliştirilmesine dikkat çekmektedir (Khangwiset ve ark., 2011). Mısır, pirinç, antepfıstığı, mısır gevreği ve yer fıstığı gibi çok çeşitli tarım ürünlerinde bulunurlar (Edupuganti ve ark., 2013). Aflatoksinler kimyasal olarak bir çift-furan-halkası ve bir kumarin parçasından oluşan bir difuranokumarin türevi grubudur; furofuran kısmı, toksik ve kanserojen aktivite için gereklidir (Wogan ve Newberne, 1971).

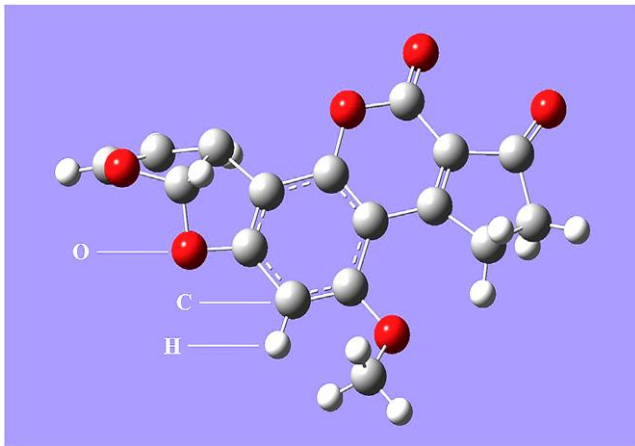
En önemli kabul edilen altı aflatoksin türü (B1, B2, G1, G2, M1 ve M2) vardır. B grubu aflatoksinler (B1 ve B2) bir siklopentan halkası içerirken benzeri G-grubu bir lakton halkasına sahiptir. Ultraviyole ışığın ışınması altında mavi veya yeşil (B ¼ mavi, G ¼ yeşil) floresans yayabilirler. Aflatoksin M1 ve M2 sütte bulunan aflatoksinlerdir ve AFB1 ve AFB2'nin hidrosillenmiş ürünleridir. 6 bileşik arasında, AFB1 genellikle miktar olarak baskındır ve en zehirli maddeyi oluşturur (Wang ve ark., 2016). Aflatoksinlerin temel kimyasal özellikleri Çizelge 2.5'de verilmektedir.

Çizelge 2.5. İlk olarak Hartley, Nesbitt ve O'Kelly tarafından belirlenen aflatoksinlerin temel fizikokimyasal özellikleri (Hartley, Nesbitt, O'Kelly, 1963; Benkerroum, 2019).

Aflatoksin	Kristalizasyon çözücüler	UV ışık altında floresan (360 nm)	Floresan spektrum		MW	Erime noktası °C	Kimyasal formül
			Uyarılma dalgaboyu (nm)	Emisyon dalgaboyu (nm)			
Aflatoksin B1	Trikloroetilen/kloroform	Mavi	365	425	312	265-270	C ₁₇ H ₁₂ O ₆
Aflatoksin B2	Metanol	Mavi	365	425	314	305-309	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
Aflatoksin G1	Metanol	Yeşil	365	450	328	247-250	C ₁₇ H ₁₂ O ₇
Aflatoksin G2	Metanol	Yeşil-mavi	365	450	330	237-240	C ₁₇ H ₁₄ O ₇

2.2.3.1. Aflatoksin B1

Aflatoksinler, özellikle AFB1, insanlardaki akut toksikolojik etkilerinden dolayı büyük ilgi görmüştür (Piletska ve ark., 2010). AFB1, potasyum siyanidinkinden 10 kat, arsenikden 68 kat ve hepatoselüler karsinoma neden olan (indükleyen) dimetil nitrozaminin 75 kat daha ciddi kanserojen toksisiteye sahiptir. AFB1'in insanlara akut toksisitesi nedeniyle, 1993 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) ve dünyanın en güçlü kanserojenlerinden biri olan I. Grup Kanserijen olarak kabul edilmiştir (IARC, 1993). AFB1'in büyük tehlikeleri ışığında, birçok ülke ve kuruluş katı yasal sınırlar koymuş durumdadır. Dünya Sağlık Örgütü, Codex Alimentarius Komisyonu, Avrupa Birliği (AB), Amerika Birleşik Devletleri ve Japonya, gıdalardaki toplam aflatoksin seviyesinin (B1 + B2 + G1 + G2) 15 µg.kg⁻¹'den düşük olması gerektiğini öngörmüştür (Liang ve ark., 2018). Bunlar arasında AFB1, en yüksek toksisiteye sahip bilinen en güçlü doğal kanserojen maddedir. AFB1'in ortalama ölümcül dozu (LD50), oldukça toksik zehir aralığına ait olan 0.36 mg.kg⁻¹'dir (vücut ağırlığı). Moleküler formülü C₇H₁₂O₆'dır ve 365 nm UV ışığına maruz kaldığında mavimor flüoresans yaymaktadır. Moleküler ağırlığı 312-346 Da'dur ve kimyasal yapısı Şekil 2.3'de gösterilmiştir (Xue ve ark., 2019).



Şekil 2.3. Aflatoksin B1'in kimyasal yapısı.

Uluslararası kanser ajansı tarafından araştırmalar AFB1'in yüksek oranda kanserojen (Cordeiro ve ark., 2013; Yang ve ark., 2016), mutajenik (Bhattacharya, Francis, & Shetty, 1987) ve teratojenik (Macholz, 1988) olduğunu kanıtlamak için yeterli insan epidemiyolojik ve hayvan deneyleri olduğunu göstermiştir. Raporlar ayrıca AFB1'in primer karaciğer kanseri, mide kanseri, akciğer kanseri gibi hastalıklara neden

olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, deneysel bir hepatokarsinojen olarak AFB1'in, insan hepatik (karaciğer) selüler kanserinin (HCC) multifaktöriyel etiyolojisinde önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. AFB1 genellikle meyveler, tahıllar, şaraplar, kuruyemişler, baharatlar ve soya ürünleri gibi gıda maddelerinde bulunur ve normal endüstriyel işlem veya pişirme ile tahrip edilemezler çünkü ısıya dayanıklıdır. Yukarıda belirtilen AFB1'in akut toksisitesi, yaygınlığı ve kimyasal kararlılığı giderilmesini zorlaştırır ve bu nedenle en iyi kontrol yöntemi oluşmasını önlemektir. Bu nedenle, ülkeler arasında izin verilen maksimum toksin seviyeleri farklılık gösterse de, toksinlerin neden olduğu sağlık sorunlarını en aza indirmek için AFB1 ile ilgili son düzenlemeler yapılmıştır. Gıda maddelerinde çoğu ülke tarafından belirlenen mevcut maksimum izin verilen seviye 20 ng.mL^{-1} 'dir ve dünyadaki belli başlı ülkelerde ve bölgelerde AFB1'in izin verilen maksimum içeriği Çizelge 2.6'da gösterilmektedir. Bu nedenle, AFB1 tayini için çeşitli yöntemler kullanılmıştır (Xue ve ark., 2019).

Çizelge 2.6. Gıdalarda AFB1 maksimum izin verilen limitler.

Ülke	Gıda Maddesi	Kabul Edilebilir En Yüksek Limitler ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Türkiye	Tüm gıda maddeleri	5
	Baharatlar	5
	Hububatlar	2
Çin	Mısır, Fıstık ve ürünleri	20
	Pirinç, bitkisel yağlar	10
	Bebek maması	5
	Diğerleri	5
Avrupa Komisyonu	Fıstık, tahıl, fındık ve kuru meyveler	2
	Pirinç	5
FDA		20
Romanya		2
Hindistan		30
Vietnam		20
Kore		10
Japonya		10
Güney Afrika		
Arjantin		5
Avusturalya		
Singapur		

Bu alanlardaki pek çok ilerlemeye rağmen, AFB1'in düşük izin verilen seviyeleri ve şiddetli toksisitesi göz önüne alındığında, algılamanın basitliğini, seçiciliğini ve hassasiyetini arttırabilecek yeni yaklaşımlar bulmak hala zordur (Xue ve ark., 2019). AFB1 tayininde hassas ve uygun maliyetli analitik yöntemler geliştirilmesi için büyük

çaba sarf edilmiştir. Her ne kadar ince tabaka kromatografisi (TLC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) şu anda kullanılmakta ve yaygın olarak kabul edilen tayin yöntemleri olmakla birlikte, bu yöntemler uzman personel, pahalı ekipmanlar ve kapsamlı numune hazırlama yöntemi gerektirmektedir (Park ve ark., 2014). Bu nedenle, sahada mikotoksinlerin tayini için hızlı, basit, düşük maliyetli, hassas ve taşınabilir cihazlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu yöntemler arasında, nanomalzemelerin gelişimi, yüksek performansları ve çok yönlü özellikleri nedeniyle, AFB1'in son derece hassas, seçici ve basit bir şekilde tayin edilmesini sağlayarak ve süreci karmaşık, zaman alıcı, emek gerektiren pahalı geleneksel yöntemlerin kısıtlamalarının üstesinden gelerek mükemmel umutlar sunmaktadır (Xue ve ark., 2019).

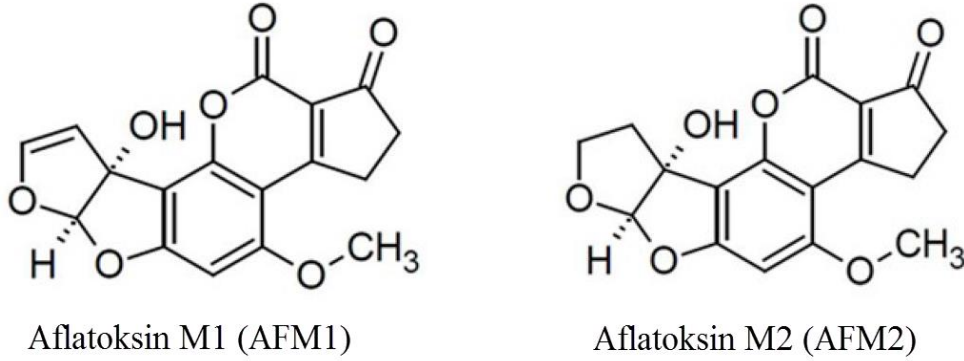
2.2.3.2. Aflatoksin M1

Süt, insan sağlığının gelişimi ve sürdürülmesi için makro ve mikro besinler sağlayan bir temel gıdadır. Ancak çevresel ve gıda kirletici bir araç haline gelebilir ve onu tüketen kişilerde çeşitli fizyolojik değişikliklere neden olabilir. Sütte bulunan mikroorganizmalar ve bunların metabolitleri, üreyen memelilerin sıvıları ve dokularına göç ederek hasara neden olabilir. Sütte bulunan aflatoksinler gibi kirleticilerin toksik etkilerine yetişkinlere göre daha duyarlı olan çocuklar ve bebekler için ciddi bir endişe vardır (Scaglioni ve ark., 2014).

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* gibi çeşitli mantar türleri tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Bu organizmalar tarımsal ürünleri kirletir ve özellikle aflatoksinler B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) ve G2 (AFG2) üretir. AFB1 ve AFB2 ile kontamine olmuş yiyecekleri yiyen hayvanlar, bu aflatoksinleri hidrosilatlayabilir ve Aflatoksin M1 (AFM1) ve M2 (AFM2) ile kontamine olmuş süt ürünleri verebilir (Creppy, 2002; Khansili, Rattu, & Krishna, 2018).

Aflatoksinler arasında AFB1, yemde bulunan son derece toksik kirletici maddedir ve daha sonra kontamine olmuş yemlerin emziren memelilere maruz bırakılması, karaciğer sitokrom P450 enzimi tarafından metabolize edilen ve kanserojen yan etkileri bilinen AFB1'in 4-hidroksi metataboliti olan AFM1'in sütte salgılanmasına yol açmaktadır (Sharma ve ark., 2016). AFB1 kontamine yem inekler tarafından alındığında, 9a pozisyonunda AFB1'in enzimatik hidrosilasyonu ile AFM1'e dönüştürülür ve yaklaşık

% 0.3 ila % 6.2'ye eşit bir toplam dönüşüm oranına sahiptir. Sonuç olarak AFM1 ineklerin meme bezi tarafından salgılanır (Shadjou ve ark., 2018).



Şekil 2.4. AFM1 ve AFM2 mikotoksinlerin kimyasal yapıları.

Başlangıçta Grup 2B ajanı olarak sınıflandırılan bu toksin, şunda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından Grup 1 olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Shadjou ve ark., 2018). Düzenleme kurumları gıda ve insan sağlığı güvenliğini sağlamak amacıyla, bebekler için ana besin maddesi olarak kabul edilen süt ve süt ürünlerinde maksimum AFM1 kalıntı seviyesini (maximum residue level: MRL) belirlemiştir. Avrupa topluluğunda, Avrupa Komisyonu Yönetmeliği, AFM1 için süt ve süt ürünlerinde 50 ng.kg⁻¹ veya 50 ppt seviyesinde çok katı MRL belirlemişlerdir. İzin verilen maksimum sınır, bebek sütü ve bebek maması için daha da düşüktür; 25 ng.kg⁻¹. AFB1'in hidroksilenmiş bir metaboliti olan Aflatoxin M1 (AFM1), genellikle hayvansal dokularda ve sıvılarda (süt ve idrar) bulunur. Örneğin, süt veren hayvanlar AFB1 ile kontamine yemleri yediklerinde AFM1'i sütlerine salgırlar (Polan, Hayes, & Campbell, 1974) ve ardından çok çeşitli süt ürünlerinde bulunabilirler.

AFM1, ana bileşiği AFB1 ile aynı kanserojen, mutajenik ve toksik aktivitelere sahiptir ve ayrıca pastörizasyon işlemi gibi ısı işlemler sırasında oldukça karardır. Bu nedenle, düşük derişimlerde bile AFM1 yutulması, insan sağlığına, özellikle en çok süt tüketicileri olan çocuklar için önemli bir risktir (Rastogi ve ark., 2004). Bu nedenle, birçok ülke AFM1 için çeşitli gıdalarda 0.01-0.5 mg.L⁻¹ aralığında maksimum sınırlar koymuştur (European Commission Regulation, 2001 & 2004) (Peng ve ark., 2016).

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Gıda Tarım Örgütü (FAO) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) gibi birçok ulusal ve uluslararası

kamu sağlığı ve devlet kurumu, gıda ve yemde mikotoksin kirliliği ve başlıca mikotoksin sınıfları için katı kurallar benimseyerek bu küresel sorunu ele almıştır. şu anda, yaklaşık 100 ülke gıda ve yemde önemli mikotoksinlerin varlığına ilişkin sınırlar belirlemiştir. Çizelge 2.7'de önemli toksinler, ana üreticiler ve yaygın olarak kirlenmiş olmuş bazı gıda ürünleri ile ABD, FDA ve AB gıda ve hayvan yemlerindeki mikotoksin seviyeleri için düzenleyici sınırlar listelenmiştir (Bennett ve Klich, 2003; Alshannaq ve Yu, 2017; Lee ve Ryu, 2017; Moretti, Logrieco, & Susca, 2017).

Çizelge 2.7. Başlıca mikotoksinlerin gıda ve hayvan yemi seviyelerinde FDA ve EU maksimum limitleri (Alshannaq & Yu, 2017).

Mikotoksin	Mantar Türleri	Gıda Ürünleri	US/FDA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	EU (EC 2006) ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Aflatoksinler B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Mısır, buğday, pirinç, fıstık, sorgum, badem, fındık, incir, pamuk tohumu, baharatlar	Toplam 20	AFB1 için 2-12 Toplam için 4-15
Aflatoksin M1	AFB1 metaboliti	Süt ve süt ürünleri	0.5	Sütte 0.05, bebek mamaları ve bebek sütünde 0.025
Okratoksin A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Tahıllar, kuru üzüm, şarap, üzüm, kahve, kakao, peynir	-	2-10
Fumonisin B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Mısır, mısır ürünleri, sorgum, kuşkonmaz	2000-4000	200-1000
Zearalenone	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Tahıllar, tahıl ürünleri, mısır, buğday, arpa	-	20-100
Deoksinivalon	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Tahıl ve tahıl ürünleri	1000	200-50
Patulin	<i>Penicillium expansum</i>	Elma, elma suyu ve konsantresi	50	10-50

2.2.3.3. Okratoksin A

Okratoksin A (OTA) en sık görülen mikotoksinlerden biridir ve hem insanlarda hem de hayvanlarda nefrotoksik, kanserojen, immünoşüpresif ve teratojenik olduğu bildirilmiştir (Malir ve ark., 2013; Qi ve ark., 2014). Bu toksin, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsinin filamentöz (ipliksi) mantarları tarafından üretilen toksik bir ikincil metabolittir. *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. steynii*, *A. niger* ve *A. westerdijkiae* gibi *Aspergillus* cinsinin farklı türleri OTA üretebilmektedir. Buğday, mısır, arpa, yulaf, pirinç, meyve, fındık ve baharat gibi geniş bir gıda ürün yelpazesinde ve kahvaltılık tahıllar, ekmek, kahve, çikolata, şarap ve bira gibi türetilmiş ürünlerde tespit edilmiştir (Molinié ve ark., 2005; Zinedine ve ark., 2007; Vidal ve ark., 2013). Toksin oluşumu bazen oldukça yüksektir ve yasal sınırı aşmaktadır. Kontaminasyon, tohumlarda besleyici ve sağlıklı kalite kaybına ve çimlenme seviyesinin düşmesine neden olur, bu nedenle verim kaybı yaşanmaktadır. OTA, üzüm, kuru üzüm, siyah-beyaz çekirdeksiz kuru üzüm, hurma, kuru erik ve kuru incir gibi çok çeşitli meyveler ve kuru meyveler bulaşabilir. Bu tip ürünlerde OTA, siyah aspergilli türleri, özellikle *A. carbonarius* tarafından üretilmiştir ve sahada kontaminasyon meydana getirmiştir (Iamanaka ve ark., 2005; Zinedine ve ark., 2007; Lucchetta ve ark., 2010).

Üzüm, kuru üzüm ve işlenmiş üzüm ürünlerinde OTA seviyesi, özellikle yüksek bulunmuştur; Avrupa Topluluğu üzüm suyu, şarap ve kuru gıdalardaki $2.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ olan OTA limit derişimi $4.95 \mu\text{g.kg}^{-1}$ olarak fazla bulunmuştur. Tropikal bölgede, OTA başlıca kahve çekirdeklerinde *A. ochraceus* ve *A. westerdijkiae* tarafından üretilmektedir. OTA hem yeşil kahve, kavrulmuş kahve hem de hazır kahvede bulunmuştur. Yeşil kahve örneklerinde OTA, 0.2 ila $62 \mu\text{g.kg}^{-1}$ arasında değişen derişimlerde bulunmuştur (Heilmann, Rehfeldt, & Rotzoll, 1999; Romani ve ark., 2000). Benzer şekilde ham kakao ve kakao yağı, kakao tozu, kekler ve çikolata gibi kakao gibi ürünleri OTA kontaminasyonu ile ilişkilendirilebilir (Copetti ve ark., 2013) Kakao ürünlerinde aflatoksin ile OTA 'nın birlikte olduğu bulunmuştur (Copetti ve ark., 2012). İnsanlar OTA'ya sadece kontamine gıdaların tüketimi ile değil, aynı zamanda havadaki OTA solunarak da maruz kalabilirler. Kahve, kakao çekirdekleri ve baharatların dönüşüm birimlerinde tüketicilerin ve çalışanların kanında OTA tespit edilmiştir (Iavicoli ve ark., 2002; Sangare-Tigori ve ark., 2006). Bitkisel ürünlerin yanı sıra et ürünlerinde de OTA bulunabilir. Çok sayıda çalışma OTA'nın hem yüzeyde hem

de içerikte bu ürünlerde bulunduğunu göstermiştir (Rodríguez ve ark., 2012; Nguyen ve ark., 2017).

2.3. Küçük Moleküller

2.3.1. Küçük Moleküllerin Başlangıcı Ve Oluşumu

Küçük moleküller tipik olarak 1000 Da'nın altında olan düşük moleküler ağırlıklı organik moleküller olarak adlandırılabilir. Bu kategori, doğal veya teknoloji kökenli, birçoğu biyolojik, farmakolojik veya çevresel açıdan ilgili olan çeşitli kimyasalları içermektedir. Bu kimyasalların algılanması ve miktar tayini birçok disiplinde oldukça önemlidir. Doğal olarak, hemen hemen her hücre, ortak amino asitler, nükleotidler, şekerler ve bunların fosforlanmış türevleri dahil, 100 ila 200 farklı düşük molekül ağırlıklı organik molekül koleksiyonu içerir. Ek olarak, belirli hücre tiplerine veya organizmalara özgü çok çeşitli küçük biyomoleküller mevcuttur, örneğin birçok bitki, bitkilere kendi karakteristik kokularını veren bileşikleri ve morfin, nikotin gibi bileşikleri içeren ikincil metabolitleri içerir ve kafein insanlar üzerindeki fizyolojik etkilerinden dolayı değerlidir. Diğer taraftan sentetik biyoloji ile üretilmiş küçük sentetik molekülleri tayin etmek için farmasötik, klinik, çevresel veya gıda analizi de dahil olmak üzere çok çeşitli alanlarda geniş bir yelpazede uygulanmıştır. Küçük moleküllerin çoğu gıda, yem ve diğer tarım ürünlerinde iyi bilinen kirleticilerdir. Örneğin, ipliksi mantarlar tarafından ikincil metabolitler olarak üretilen mikotoksinler, farklı fizikokimyasal özelliklere ve kanserden akut toksisiteye ve gelişim kusurlarına kadar değişen çeşitli etkilere sahip 500'den fazla farklı küçük molekülü içerir. Tarımsal açıdan, en kritik mikotoksinler, dünyadaki mahsullerde yaygın kirletici maddeler olan aflatoksinler, fumonisinler, trichothecenes, okratoksinler ve zearalenone familyasıdır. Algal toksinler, fitotoksinler ve siyanotoksinler, sırasıyla, toksikojenik mikroalg ve siyanobakteriler tarafından üretilir ve deniz besin zincirine fitoplanktonlar ve ardından kirlenmiş deniz ürünleri yoluyla insanlara ulaşabilir. Deniz ürünlerinden kaynaklanan bazı küçük molekül toksinlerinin paralitik kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi, kirpi balığı zehirlenmesi ve nörotoksik kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesi gibi ciddi hastalıklara neden olduğu bilinmektedir ve deniz ürünleri zehirlenmelerinin sıklığı arttığı ve yeni zehirlenmelerin ortaya çıktığı bildirilmiştir. Yukarıda bahsedilen bütün toksinlerin, insan ve hayvan sağlığına yönelik bir tehdidin yanı sıra, ayrıca su ve

tarımda önemli ekonomik kayıplara neden olduğu bilinmektedir ve bunların çoğu ulusal ve uluslararası düzenlemelere tabidir (Peltomaa ve ark., 2018).

Birçok küçük molekül, geleneksel olarak genellikle yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlayan kromatografik yöntemlerle tayin edilir. Ancak, yüksek maliyetli, hacimli enstrümantasyon ve gerekli uzmanlık nedeniyle, bu yöntemler her amaç için uygun değildir; buna karşılık biyosensörler daha ucuz ve daha hızlı bir alternatif sunmaktadır.

Geleneksel enzim bağlı immünosorbent deneylerinden (ELISA) ve lateral akış testlerinden mikrodizilere ve flüoresan veya elektrokimyasal sensörlere kadar değişen çeşitli küçük molekül analitleri için çeşitli biyosensörlerin ve biyoanalitik deneylerin sayısız örneği rapor edilmiştir. Biyosensörlerin küçük molekül tayini için klasik yöntemlere göre avantajlarından bazıları; eş zamanlı izleme, yüksek seçicilik, hızlı cevap süreleri, organik çözücülerin tüketiminin azaltılması ve örnek manipülasyonu, taşınabilirlik, kompaktlık ve kalifiye personel ihtiyacını önleyen kolay kullanımındır.

2.3.2. Küçük Moleküllerin Tayini İçin Biyosensörler

Genel olarak, biyosensörler bir biyoreseptör, hedef analiti yakalayan tanıma elamanları ve özellikleri analitin bağlanması üzerine değiştirilen bir dönüştürücüden oluşur. Analite bağlanma yeteneğine sahip belirli bir biyotanıma temelli sistemler oldukları için afinite biyosensörleri olarak tanımlanabilir.

Antibadiler, olağanüstü seçicilikleri ve duyarlılıkları nedeniyle en çok kullanılan biyoreseptörlerden biridir, ancak nükleik asitler, aptamerler, peptitler ve moleküler baskılanmış polimerlerde (MIP'ler) yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan katalitik biyosensörler, analiti tanıyabilen ve bunları kimyasal bir reaksiyonla bir ürüne dönüştürebilen bir enzim veya tüm hücre gibi bir biyoreseptöre dayanmaktadır. Genellikle, biyoreseptör, biyolojik tanıma olayında, bağlanma olayını ölçen farklı aktarım şemaları ile izlenebileceği bir dönüştürücünün yüzeyinde sabitlenir. Bağlanma olayı, örneğin, kütlede bir artış ya da yüzeyin elektriksel direnç ya da kırılma endeksinde bir değişiklik meydana getirebilir; bu, mekanik, elektriksel ya da optik sinyaller gibi çeşitli tayin yöntemleri ile izlenebilir (Damborský, Švitel, & Katrlík, 2016).

Optik transdüserler, bir fotodetektör tarafından kaydedilebilen emme, yansıma, emisyon veya interferometrik model gibi analit varlığında optik özelliklerdeki bir değişikliği ölçmeye dayanmaktadır. Birçok optik biyosensör, biyotanıma olayını ölçmek için bir

araç olarak kullanılan flüoresan boyalar, enzimler veya nanopartiküller gibi etiketlerin kullanılmasını gerektirir. Her ne kadar bu tür etiket temelli yöntemler yaygın olarak kullanılsada ve genellikle çok hassas olsalar da, kaçınılmaz olarak, etiketi biyolojik olarak tanıma olayına bağlamak için bir etiketin ve kimyasal bir birleştirme adımının dahil edilmesini gerektirir. Etiketleme zorunluluğu, bu yöntemleri konjugasyon adımının başarısı ve etkinliği ile sınırlandırmaktadır ve bazı durumlarda ayrıca biyolojik tanıma olayını değiştirebilir. Bu nedenle, etiketsiz biyosensörler bağlanma olayını izlemek için bir etiket kullanılmasını gerektirmediğinden, etiket temelli yöntemlere göre bazı önemli avantajlar ve daha iyi doğruluk sunabilir. Etiketsiz yöntemlerin avantajları, basitliği ve ölçüm prosedürünün hızını; bu yöntemler bağlanma reaksiyonunun gerçek zamanlı izlenmesini sağlar, böylece moleküler tanıma işleminin kinetik ve termodinamik parametrelerine erişim sağlar (Fan ve ark., 2008; Khansili ve ark., 2018). Küçük moleküllerin tayini için biyosensörlerin geliştirilmesi, daha büyük analitlerde sorun olmayabilecek belirli zorlukları ifade etmektedir. İlk olarak, küçük moleküller birçok tanıma elemanı için, özellikle antibadiler için zorlayıcı hedeflerdir, çünkü tek başına haptenler, antibadi üretiminden sorumlu olan bağışıklık sistemini stimüle edememektedir. Sonuç olarak, hapten-spesifik antibadiler genellikle daha büyük bir taşıyıcı moleküle konjüge edilmiş hapten kullanılarak seçilir; bu, bazen serbest hapten yerine konjugat için spesifik antibadilerle sonuçlanır. Ayrıca, amino asit gibi fizyolojik yolların bileşenleri olan küçük moleküller immünojenik değildir. Rekombinant antikorlar, monoklonal ve poliklonal antikorlar için ilginç bir alternatif olarak sunuldu ve son yirmi yıl boyunca birkaç rekombinant antikor temelli immünoassay ve sensör rapor edilmiştir. Potansiyel olarak, rekombinant antibadi, geleneksel eşleniklerinin bazı sınırlamalarının üstesinden gelebilir; genetik mühendisliği ile modifiye edilebilir veya protein saflaştırması için tasarlanan reaktif grupları veya etiketleri içerebilir. Küçük boyutlarından ötürü, rekombinant antibadi fragmanları, bozulmamış antibadilere kıyasla düşük spesifik olmayan bağlanma ve düşük sterik engellemeye katkıda bulunabilir. Ancak bazı ilginç özelliklere rağmen, rekombinant antibadiler, nadir derişimlerde, geleneksel antibadilere göre daha iyi ve hatta benzer eğilimler göstermektedir; düşük derişimlerde bulunan küçük moleküllerin tayini için kullanımlarını sınırlandırır ve dolayısıyla yüksek afiniteye sahip tanıma elemanlarını gerektirir.

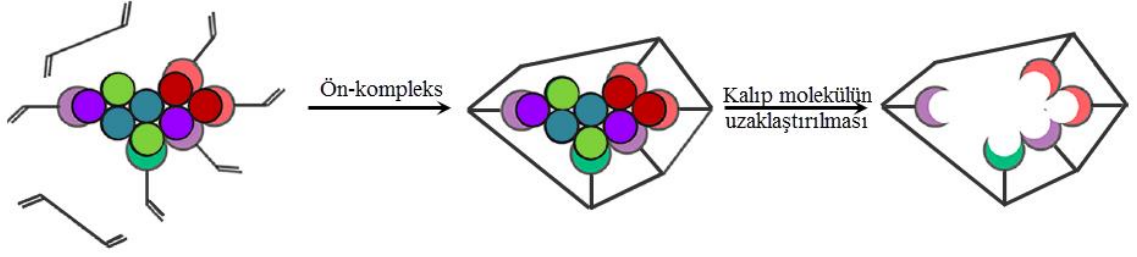
Alternatif olarak, biyosensörler diğer birkaç biyoreseptöre veya biyotaklit (biyoinspired) tanıma elemanlarına dayanabilir. Aptamerler, hedef molekülleri yüksek seçicilik ve

hassasiyetle bağlanmalarını sağlayan üç boyutlu bir yapı oluşturan kısa sentetik DNA veya RNA molekülleridir (Fodey ve ark., 2011). Aptamerler, immobilizasyon veya etiketleme amacıyla kolayca sentezlenir ve modifiye edilir. Aptamerler küçük boyutları, yüksek kimyasal ve termal kararlılıkları ve düşük maliyeti nedeniyle antibadiler için ilginç bir alternatif olabilir. Yinede küçük boyutlu analitler için iyi aptamer bağlayıcıları bulmak özellikle zor olabilir. Bu nedenle, aptamer temelli etiket içermeyen yöntemler, tanıma elemanının eksikliklerini telafi etmek için genellikle farklı sinyal amplifikasyon yöntemlerine dayanmaktadır. Biyosensörlerde kullanılan ilk tanıma elemanları arasında bulunan enzimler hedefler için oldukça iyi bir seçimdir. Ancak immobilizasyon sonucu zayıf kararlılık veya aktivite kaybı ile kullanımları sınırlandırılabilir (Rhouati ve ark., 2016).

Plastik antibadiler olarak da bilinen moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler) yapay malzemelerdir ve açıkcası tanımı gereği biyolojik tanıma elemanı temelli bir biyosensör tanımına uymamaktadır. MIP'ler yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılığı, sağlamlığı, düşük maliyeti ve hazırlama kolaylığı nedeniyle biyosensör gelişimi için heyecan verici bir seçenektir. Moleküler baskılama, antibadiler, enzimler veya diğer protein reseptörleri gibi bazı biyolojik reseptörlere benzer şekilde analite seçici afiniteye sahip bağlama bölgeleri içeren isteğe uyumlu (custom-made) polimerik malzemelerin tasarlanmasına ve hazırlanmasına izin verir. MIP sentezi için, baskılama için seçilen hedef molekülü bir çapraz bağlayıcı varlığında polimerleşebilen fonksiyonel monomerlerle kovalent veya kovalent olmayan bağlar ile etkileşime girer. Hedef molekül uzaklaştırıldığında, ortaya çıkan üç boyutlu supramoleküler yapı, hedef moleküle tamamlayıcı olan spesifik tanıma bölgeleri içermektedir (Moreno-Bondi ve ark., 2008; Wanekaya, Chen, & Mulchandani, 2008; Peltomaa ve ark., 2018).

2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) hedef molekülün sentetik reseptörleridir. Bu nedenle doğal antibadi-antijen sisteminin analogları diyebiliriz. Modern dünyada çevreyi algılama, taklit etme her yerde yaygınlaşmıştır. Moleküler tanıma, belki de esas algılama tipi (biyolojik süreçler için temel olan ve hali hazırda algılama sistemi) ayırma, kataliz gibi süreçlerdeki öneminden dolayı çoğu kimyasal araştırmanın konusu olmuştur (Belbruno, 2019).



Şekil 2.5. Moleküler baskılamanın genel süreci.

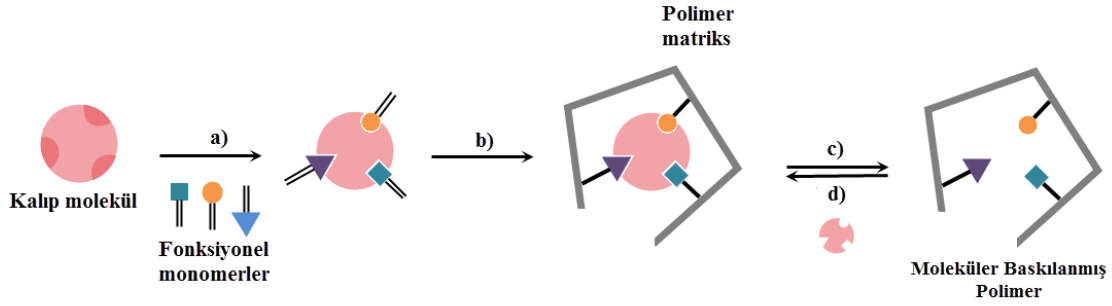
Doğal sistemler bir dizi yabancı cisme karşı antibadileri üretebilirken, kimyasal süreçlerde bu tür reseptörlerin kullanılması maliyet ve çevresel koşullara karşı duyarlılık gibi birçok engelle karşı karşıya kalmaktadır. Modern sensör araştırmalarının hedefi benzer spesifiklik ve hassasiyet ile doğal antibadi-antijen davranışını taklit eden sentetik reseptörlerin oluşturulmasıdır. Bu moleküler tanıma, tanıma elementlerindeki değişiklikleri izlemek için modern teknolojiler ile birleştirildiğinde müdahalesiz bir şekilde hedefleri izleyebilen ve tayin edebilen seçici hassas sensörleri vaat etmektedir (Belbruno, 2019).

Bu nedenle üretim sırasında baskılanan analite seçici bağlanması için bir ‘anahtar ve kilit’ mekanizması ile çalışırlar. MIP’ler potensiyel olarak çevre koşulları ve düşük maliyet açısından dayanıklılığın avantajları ile biyolojik reseptörlerin spesifikliğini ve seçiciliğini sunmaktadır. Örneğin, doğal reseptörler tipik olarak insan vücudu sıcaklığı aralığındaki sıcaklıklarda saklama ve uygulama gerektirir fakat bir polimer matriks temelli MIP’ler, genellikle bir özel çevre saklama koşulları gerektirmediğinden, genellikle sınırsız olarak saklanabilir ve çok daha geniş bir sıcaklık aralığında uygulanabilmektedir (Saylan ve ark., 2019).

Moleküler baskılamanın birçok farklı yöntemi vardır. Ancak yöntemlerin tümü aynı temel basamakları izlemektedir;

- (1) fonksiyonel monomere kovalent veya kovalent olmayan şekilde bağlanmış kalıp veya hedef molekülü içeren bir polimer üretilir,
- (2) kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır (desorpsiyon adımı), kalıp moleküle özgü spesifik bağlanma bölgeleri oluşur,
- (3) MIP kalıp molekül içeren örnek ile etkileştiğinde, kompleks ortamda kaviteye sadece kalıp molekül spesifik bir şekilde bağlanır.

Genel süreç Şekil 2.6’de gösterilmiştir (Belbruno, 2019).



Şekil 2.6. Moleküler baskılama sürecinin şematik gösterimi; (a) ön kompleks; (b) polimerizasyon; (c) kalıp molekülün uzaklaştırılması; (d) geri bağlanma.

2.4.1. Moleküler Baskılamanın Tarihi

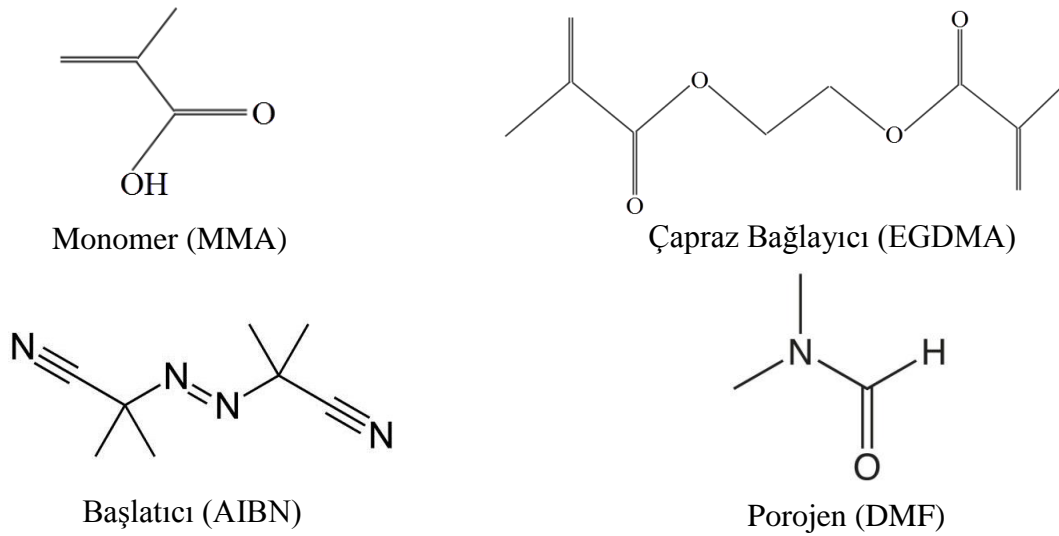
Chemical Abstract’ın bir araştırması; özellikle “imprinted polymer” olarak bildirilen ilk makalenin Lund’da K. Mosbach and B. Sellergren tarafından 1984 yılında yayınlandığını göstermektedir. “Imprinted polymer” teriminin kullanıldığı ilk makale 1985 yılında G. Wulff tarafından yazılmıştır fakat 1973’den beri Wulff “Enzim-Analog Yapılı Polimerler” başlıklı bir seride makaleler yayınlamıştır. Bu ilk araştırmacılar bilimin farklı yönlerini geliştirmiştir.

Mosbach grubu kalıp ve polimer matriks arasındaki kovalent olmayan etkileşimleri kullanmaya odaklanırken, Wulff baskılama (imprint) oluşturmak için kovalent bağlanmayı kullanmaya yönelmiştir. İki yöntem arasındaki fark baskılanan molekülü MIP’den uzaklaştırmak için uygulanan kimyadır. Önemli biçimde kovalent sentezin daha homojen bir geri bağlanma kavimleri üretmesi, ve potansiyel olarak daha hedef-spesifik MIP’ler elde edilmesi beklenir. Mosbach and Sellergren ayırma ve algılama (sensing) materyalleri geliştirdiğini açıklamıştır, Wulff yoğun olarak katalitik tepkimelerde baskılanmış polimerleri çalışmıştır, 1993’te K. Shea’nın canlı farelere yerleştirilmiş plastik bir antikor gibi benzersiz biyolojik uygulamalar hakkında benzer çalışmalar yaptığı rapor edilmiştir.

MIP’lerin üretimini açıklayan çalışmalar olmasına rağmen “moleküler baskılanmış polimer sensör” terimi 1992 yılında S. Piletsky tarafından ilk defa kullanılmıştır.

2.4.2. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Sentezi

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi bir kovalent veya kovalent olmayan etkileşimli kompleksler ağı geliştirilen fonksiyonel monomerin hedef molekül ile çözelti içinde etkileşimine izin veren en genel yöntemdir. Fonksiyonel monomer hidrojen bağlanma işlevi veya hedefe kovalent bir bağ oluşturacak reaktif bir süstitüent sağlamaktadır. Bazı yaygın fonksiyonel monomerler; akrilamid, metil metakrilat (MMA), metakrilik asit (MAA), anilin ve piroldür. Uygun dimetakrilat (EGDMA) ve polimerizasyon başlatıcısından sonra, tipik olarak azobis(izobutironitril) (AIBN) eklenir, ısıtma veya ultraviyole radyasyonla polimerizasyon başlatılır (Belbruno, 2019).



Şekil 2.7. MIP'lerin sentezinde kullanılan ajanlar; MMA: metil metakrilat; EGDMA: etilen dimetakrilat; AIBN: azobis(izobutironitril) ; DMF: dimetilformamid.

2.4.3. Moleküler Baskılanmış Polimer Temelli Sensörler

Son yıllarda, MIP'ler küçük molekül tayini için yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörlerinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Fodey ve ark., 2011). Hedef molekülün polimerin aktif bağlanma bölgeleriyle etkileşimi SPR tarafından tespit edilebilen algılama yüzeyinin (layer) dielektrik yapısında bir değişikliğe neden olmaktadır. Antibadilerle karşılaştırıldığında, MIP'ler daha zor rejenerasyon koşullarına dayanabildikleri ve bağlanma yeteneklerini yitirmelerine daha az hassas oldukları için daha sağlam bir yüzey sağlayabilirler. SPR sensör çiplerine seçici bir MIP katmanı hazırlamak için çeşitli yöntemler tanımlanmıştır ve bunlar MIP filminin veya

partiküllerinin çip yüzeyinde fiziksel olarak biriktirilmesine veya kovalent bağlanmasına dayanır veya alternatif olarak doğrudan sensör yüzeyine yerinde polimerizasyonu içermektedir. Örneğin, spin kaplama, baskılanmış nanofilm veya -jel tanıma yüzeyi içeren yüksek afinite temelli SPR sensörleri oluşturularak amoksisilin (Ayankojo ve ark., 2018), kanamycin (Zhang ve ark., 2018), antibiotics (Altintas, 2018) ve pestisitlerin (Saylan ve ark., 2017; Yılmaz ve ark., 2017) tayini için kullanılmıştır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ractopaminin tayini için bir nano hibrit filmi kullanılarak SPR sinyallerinde bir artışın elde edildiği gösterilmiştir (Yao ve ark., 2016). Ractopamin tayini için nanohibrit filmlili SPR sensörü 5.0 ng.mL^{-1} tayin sınırına sahip $20\text{-}1000 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim aralığında geniş bir doğrusalık göstermektedir.

Son zamanlarda yapılan bir başka çalışma, SPR sensör çipine biriktirilen ve kurutulan atrazin baskılanmış nanopartiküllerin kullanıldığını bildirmiştir. Nanopartiküllerin yüzeye tutturulması, taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edilerek doğrulandıktan sonra SPR ölçümleri, $0.7134 \text{ ng.mL}^{-1}$ atrazin tayin sınırı ile $0.5\text{-}15 \text{ ng.mL}^{-1}$ arasında doğrusal bir yanıt göstermiştir (Yılmaz ve ark., 2017). Saylan ve ark., pestisit baskılanmış SPR çipler hazırlayarak üç farklı pestisit türünü tayin etmişlerdir. Bu çalışmada, $0.1 \text{ nM}\text{-}6.64 \text{ nM}$ derişim aralığında siyanazin, simazin ve atrazin pestisitlerin sinyal değişimleri gösterilerek sırasıyla tayin sınırları 0.095 , 0.031 and 0.091 nM olarak bulunmuştur (Saylan ve ark., 2017).

2.5. Optik Sensörler

Bir sensör genellikle bir sinyal veya uyarı alan ve yanıt veren bir cihaz olarak tanımlanır. Bu tanım geniştir. Biyosensör terimi, 1975'lerde, bir dönüştürücü kullanarak yüzeylerdeki biyomoleküllerin doğrudan tespiti olarak tanıtılmıştır. Şu anda bir biyosensörün en belirgin örneği, bir glukoz derişimini elektronik bir sinyal olarak bildiren glukoz sensörüdür; seçici bir enzimatik işleme dayanmaktadır. Mevcut tanıma göre, biyosensörlerde sensör veya analitin tanıma elemanı (ligand) biyolojik bir kaynaktan gelmelidir. Biyosensörler, biyolojik bir element (mikroorganizma, hücre reseptörü, doku, organel, antikor, enzim) ve bir fizikokimyasal dönüştürücü içeren analitik cihazlardır. Hedef analit ve biyolojik materyal arasındaki spesifik etkileşim, dönüştürücü tarafından tespit edilen fizikokimyasal bir değişiklik üretir. Dönüştürücü daha sonra spesifik bir analit veya analit derişimi (miktarı) ile orantılı bir analog elektronik sinyal verir (Schasfoort, 2017).

Bir sensör, maddenin varlığını veya miktarını ölçen ve yorumlanabilir bir sinyale dönüştüren bir cihazdır. Biyosensör, bilinen bir analitin varlığını veya seviyesini tespit etmenin temeli olarak biyokimyasal bir etkileşimin kullanıldığı bir sensör cihazları veya sistemlerin sınıfıdır. Bu analit bir tuz gibi inorganik bir bileşik, bir vitamin veya şeker molekülü gibi küçük bir biyolojik molekül veya proteinler veya nükleik asitler gibi daha büyük biyolojik makromoleküllerin derişimi olabilir. Sensör sistemi ve analit arasındaki biyokimyasal etkileşim, biyosensör tarafından kullanılan algılama mekanizması fonksiyonel olarak analit ve biyolojik ortamı arasındaki etkileşime benzer olduğu için, algılama olayını biyolojik bir bağlanma sağlar (Resnick, 2013).

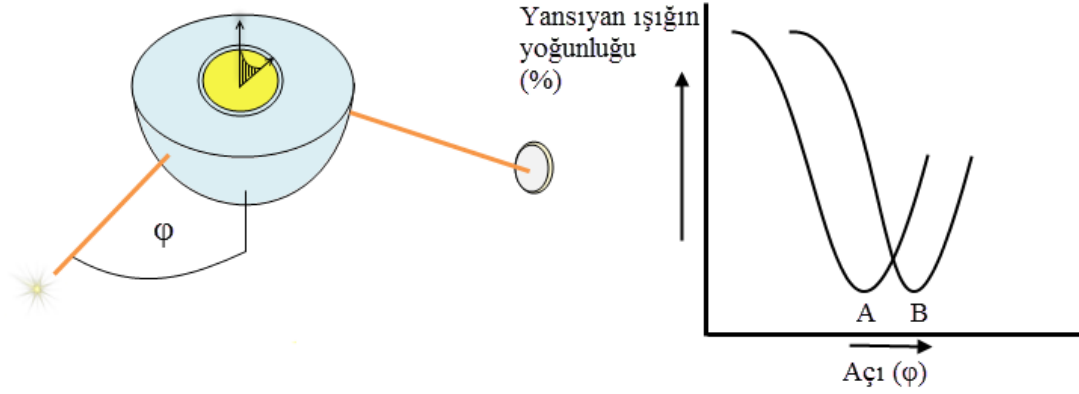
Biyosensörler, biyo-tanıma elemanına göre sınıflandırılabilir; enzim temelli, antikor temelli (immünosensörler), DNA hibridizasyon temelli (genosensörler) ve aptamer temelli (aptasensörler) veya dönüştürücü mekanizmasına göre sınıflandırılabilir; optik, elektrokimyasal, piezoelektrik ve termal (Malekzad ve ark., 2018).

Son derece hassas optik dönüştürücülerdeki son gelişmeler, biyomoleküler etkileşimlerin etkin özgülüğü, afinitesi ve çok yönlülüğü ile birleştiğinde, klinik tanı, biyomoleküler mühendislik, ilaç tasarımı, çevre kontrolü veya gıda endüstrisi gibi çeşitli alanlardaki uygulamalarla çok çeşitli optik temelli biyosensörlerin geliştirilmesini sağlamıştır. En yaygın olarak kullanılan optik biyosensörler, ince altın filmlerde yüzey plazmon rezonans (SPR) değişikliklerine dayanmaktadır (Homola, 2008). Bununla birlikte, optik nano-biyosensörler, teşhis ve tayinde etiketsiz ve yüksek verimli analiz için ihtiyaçları karşılama beklenen ince filmler yerine nano-yapılandırılmış metaller kullanılarak da tasarlanabilir (Sepúlveda ve ark., 2009).

2.6. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörler

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyomoleküler etkileşimlerin izlemesinde güçlü bir araçtır. SPR biyosensörlerinin prensibi, moleküler bağlanmanın neden olduğu kırılma indisi değişiminin rezonant spektral kaymalara dönüşümüdür (Liu ve ark., 2016, Koyun ve ark., 2019). Şekil 2.8'de gösterilen deney düzeneğinde polarize ışık, üst kısmında ince bir metal film kaplı sensör çipindeki prizmadan geçirildiğinde ışık, ayna gibi davranan metal film tarafından yansıtılır. Geliş açısının değiştirilmesi ve yansıyan ışığın yoğunluğunun izlenmesi üzerine, yansıyan ışığın yoğunluğunun asgari olarak geçtiği gözlemlenir (Şekil 2.8, line A). Bu geliş açısında, yansıtılan ışık yüzey plazmonları uyarak, yüzey plazmon rezonansını indükleyerek, yansıyan ışığın şiddetinde bir

düşüşe neden olur. Metal filmin serbest elektronları ile p-polarize ışığın fotonları etkileşime girebilir; serbest elektronların dalga-benzeri bir salınımını indükleyerek, yansıyan ışık yoğunluğunu azaltır.



Şekil 2.8. Yüze plazmon rezonans uyarımının şematik deneysel kurulumu. Altın kaplamalı bir sensör çipi yarımküre (veya prizma) üzerine yerleştirilir. Polarize ışık, sensör çipinde ışık kaynağından (yıldız) parlar. Yansıtılan ışık yoğunluğu dedektörde (disk) ölçülür. Belli bir geliş açısında (ϕ), yüze plazmonlarının uyarılması, yansıyan ışığın (A) yoğunluğunda bir düşüşe yol açar. Altın filmin yüzeyindeki kırılma indeksinin değişimi (A'dan B'ye) bir açı kaymasına neden olacaktır.

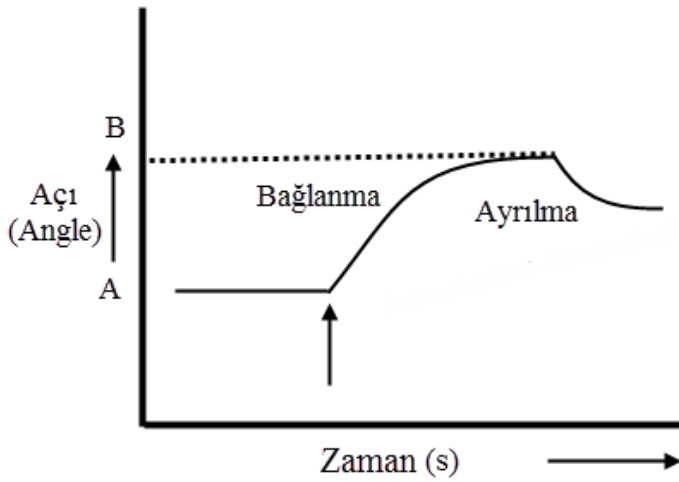
Çizelge 2.8. SPR biyosensör uygulama alanları.

Uygulanama alanları	Tayin edilen analitler	Kaynak
Biyomoleküler etkileşim izleme	Lizozim	(Subramanian ve ark., 2013)
Tıbbi teşhis	Albumin	(Kaushik, Tiwari, Deep, & Sinha, 2019)
Gıda testi	Staphylococcal enterotoxin B	(Homola ve ark., 2002)
Çevresel izleme	Pestisit profenofos	(Dong ve ark., 2012)

Yansıtılan ışık şiddetinin maksimum kaybının meydana geldiği açıya rezonans açısı veya SPR-eğim seviyesi denir. SPR-eğim açısı, sistemin optik özelliklerine bağlıdır, örneğin; metalin (genellikle altın) her iki yanındaki ortamın kırılma indeksi üzerinde. Prizma tarafındaki kırılma indeksi değişmemekle birlikte, metal yüzeyin yakın çevresindeki kırılma indeksi, ince altın film üzerinde biriken kütle (örneğin proteinler) adsorbe edildiğinde değişecektir. Son yıllarda, SPR biyosensörler çok çeşitli karmaşık

sistemlere uygulanmıştır. SPR biyosensörlerin bazı uygulama alanları Çizelge 2.8’de listelenmiştir.

Yüzey plazmon rezonans, metal yüzeyin hemen çevresindeki kırılma indisindeki değişiklikleri izlemek için mükemmel bir yöntemdir. Kırılma indisi değiştiği zaman, gözlenen minimum yoğunluk, Şekil 2.9’da gösterildiği gibi değişecektir; burada A çizgisi gelen açıya karşı yansıtılan ışık yoğunluğunun grafiğini gösterir ve B kırılma indeksindeki değişiklikten sonraki çizim alanıdır. SPR sadece bu iki koşul arasındaki farkı ölçmekle kalmaz, aynı zamanda en altta gözlenen rezonans açısı değiştiğinde zamandaki değişimi de ölçebilir. Şekil 2.9 zamanın “sensorgram” olarak adlandırılan kaymayı göstermektedir. Bu değişiklik biyomoleküler bir etkileşime bağlıysa, etkileşimin kinetiği gerçek zamanlı olarak incelenebilir.



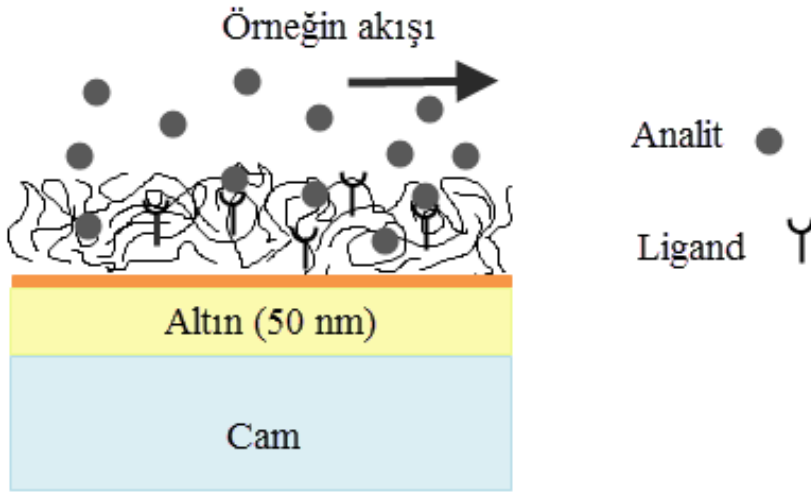
Şekil 2.9. Bir sensorgram: bağlanma (immersion) işleminin zamana göre izlendiği açı.

SPR sensörleri, metal yüzeyinde sabit bir hacimde yalnızca çok sınırlı bir bölgede çalışılabilir. Bir sinyalin gözlemlendiği elektromanyetik alanın (azalan dalga alanı) girişim derinliği, tipik olarak birkaç yüz nanometreyi geçmez, sensör yüzeyindeki metal filminden uzaklaştıkça üssel olarak azalır. Azalan dalga alanının girişim derinliği, gelen ışığın dalga boyunun bir fonksiyonudur.

SPR sensörler gerçek seçiciliğe sahip değildir: azalan dalga (evanescent) alandaki tüm kırılma indisi değişiklikleri, sinyalin değişmesine neden olur. Bu değişiklikler, ortamın kırılma indisi farkından, örneğin; tampon bileşiminde veya derişiminde ya da sıcaklık

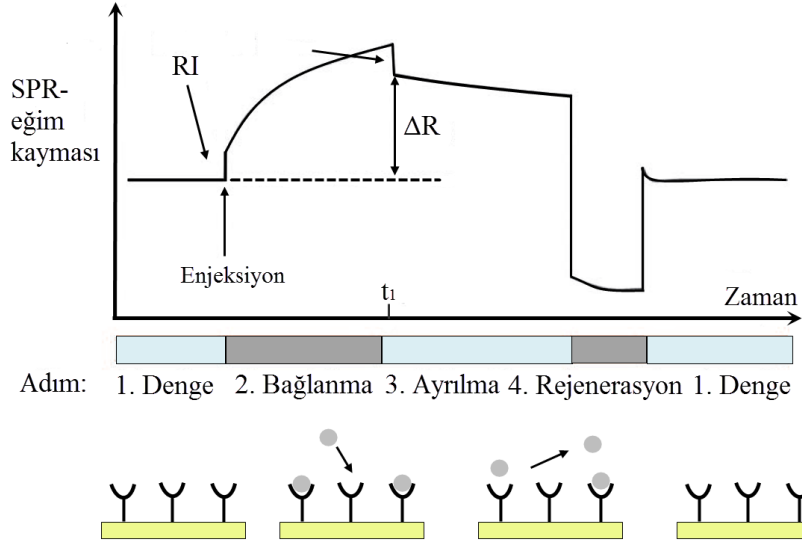
etkilerinde bir değişiklik; sensör yüzeyinde materyalin spesifik olmayan ve spesifik adsorpsiyonu kırılma indeksi değişikliklerine neden olabilir. Adsorbe edilen türlerin miktarı, Şekil 2.9'da gösterildiği gibi denge tamponun verilmesinden sonra belirlenebilir. Bir SPR sensörde seçici algılamayı sağlamak için, çip yüzeyinin hedef bileşiklerin (analit) seçici olarak yakalanması için uygun olan, ancak örnek veya tampon ortamında bulunan diğer herhangi bir bileşeni adsorbe etmeyecek ligandlarla modifiye edilmesi gerekir.

SPR analizinde, çözelti içindeki analit veya bir hedef bileşen biyotanıma elementi (ligand; yakalama elementi) tarafından yakalanır. Ligand, analit ile etkileşimi ölçmeden önce sensör yüzeyine kalıcı veya geçici olarak immobilize edilir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Etketsiz (doğrudan) algılamanın şematik gösterimi: Analit, sensör yüzeyi üzerinde immobilize edilmiş ligandlar tarafından yakalanır. Analitin birikmesi, SPR tarafından tayin edilen evanesans (azalan dalga) alanında bir kırılma indeksi değişikliğine neden olur. Burada ligand bir hidrojel içine immobilize edilmiştir.

En basit durumda, analitin ligand tarafından yakalanması ölçülebilir bir sinyale neden olur; buna *doğrudan etketsiz algılama* denir. Şekil 2.10 doğrudan algılama ile ölçüm döngüsünde adım adım sensör sinyalini göstermektedir. Immobilize ligandlara sahip çeşitli sensör çip yüzeyleri ticari olarak temin edilebilir ve daha fazlası özel olarak hazırlanıp üretilebilir (Schasfoort, 2017).



Şekil 2.11. Bir analiz döngüsünün aşamalarını gösteren sensorgram; (1) Tampon çözelti sensörle (baseline) temas etmektedir; (2) Numune çözeltisinin sürekli enjeksiyonu (birleştirme fazı): Sistem tampon çözeltisi RI analit çözeltisi RI'sinden farklı olduğunda bir kırılma indisi (RI) yığın kayması meydana gelir; (3) Tampon çözelti enjeksiyonu (elüsyon fazı); DR, bağlı hedef bileşik nedeniyle ölçülen yanıtı göstermektedir; (4) Rejenerasyon çözeltisinin enjeksiyonu (rejenerasyon adımı) sırasında bağlı türlerin yüzeyden uzaklaştırılması ve ardından yeni bir analiz döngüsü.

Her ölçüm, sensör yüzeyinin uygun bir tampon çözeltisi (1) ile şartlandırılmasıyla başlar. Yakalama olayı başlamadan önce istikrarlı bir başlangıç çizgisine sahip olmak çok önemlidir. Daha sonra sıcaklık veya hidrojel şişmesi gibi ortak durum etkileri artık dalgalanmaz. Bu noktada, sensör yüzeyi, hedef analitleri yakalamaya hazır olan aktif ligandları içerir. Analit (2) içeren çözeltinin enjekte edilmesi üzerine, bu moleküller yüzeyde yakalanır. Örneğin diğer bileşenler de sensör yüzeyine bağlanabilir; uygun bir ligand seçilmeden, bu bağlanma spesifik olmayacaktır. Bu adımda, analit molekülünün adsorpsiyon kinetiği, gerçek zamanlı bir ölçümde belirlenebilir. Daha sonra, sensör sistemine tampon enjekte edilir ve spesifik olarak bağlı olmayan bileşenler, ayrılma fazı (3) sırasında yıkanmaktadır. Şekil 2.11'de gösterildiği gibi, biriken kütle SPR tepkisinden (ΔR) elde edilebilir. ΔR spesifik yanıtı temsil etmektedir. Ayrıca bu adımda, ayrılma işleminin kinetiğinin araştırılmasına imkân vererek analitin ayrışması başlamaktadır. Son olarak, analit ve ligand (4) arasındaki spesifik bağlanmayı bozan bir rejenerasyon çözeltisi enjekte edilir. Sensör çip yüzeyine uygun şekilde immobilize

edilirse, ligandlar sensör çip yüzeyinde kalır ve hedef analitler kantitatif olarak uzaklaştırılır. Aynı sensör çip yüzeyi ile birçok test yapmak için, analiz döngüsünün yüzlerce, hatta bazen binlerce kez tekrarlanması gerektiğinden, ligandların aktivitesini bozmayan bir rejenerasyon çözeltisinin kullanılması önem taşımaktadır. Tekrar bir sonraki analiz döngüsü için yüzeyi şartlandırmak üzere tampon çözelti enjekte edilmektedir.

Bir tipik SPR sensorgram grafiği Şekil 2.11’de gösterilmiştir ve her bir basamağı ayrıntılı bir şekilde aşağıda belirtilmektedir;

1. Denge fazı: Başlangıçta denge tamponu, denge çizgisini oluşturmak için sensör yüzeyi ile temas halindedir. Sensör kalibrasyonu amacıyla, analit tamponunun RI yığın kaymasını telafi etmek için bu aşamaya bir kalibrasyon sıvısının enjeksiyonu (örn., Bazal tamponda eklenmiş ayarlanmış bir gliserol yüzdesi) dahil edilebilir.

2. Birleştirme aşaması: Hedef bileşiği içeren numune enjekte edilir; sensör yüzeyi üzerindeki yakalama elemanları, hedef bileşiği bağlar ve karmaşık formasyona neden olur.

3. Ayrılma fazı: Denge çizgisi=sistem tamponunun (adsorpsiyon çözeltisi) enjekte edilmesi üzerine, hedef bileşikler (ve ayrıca spesifik olarak bağlı olmayan moleküller) yüzeyden ayrılır.

4. Rejenerasyon adımı: Rejenerasyon çözeltisi (örn., düşük pH tamponu), kalan bağlı hedef bileşikleri uzaklaştırmak için enjekte edilmektedir (Schasfoort, 2017).

2.7. Metal Nanopartiküller

Tipik olarak 1 ila 100 nanometre (nm) arasında bir boyuta sahip olan nanopartikül malzemelerin ve yapıların, nanobilim ve nanoteknoloji uygulamaları giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Metal nanopartiküller çeşitli alanlarda önemli rol oynar. Metal nanopartikülün temel özellikleri, boyut, şekil, bileşim, kristallik ve yapısına göre belirlenmektedir. Temelde nanopartiküllerin özelliklerine ince ayar yapmak için bu parametrelerden herhangi birini kontrol etmek mümkündür (Sun ve Xia, 2002).

Tasarlanan nanomalzeme türleri nanoteller, nanotüpler, nanokristaller, küresel ve kuantum noktaları, dendritik toplanmış nanoyapılar ve metal nanopartiküller olabilir. Bakır (Cu), çinko (Zn), titanyum (Ti), altın (Au), gümüş (Ag) gibi metal nanopartiküller

(NP'ler), çeşitli alanlarda önemli bir rol oynar. Nanoteknoloji uygulamalarının hızla gelişmesi ile altın nanomalzemeler, gümüş nanomalzemeler, kuantum noktaları ve karbon nanotüpler dahil olmak üzere çeşitli nanomalzemelerde yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir.

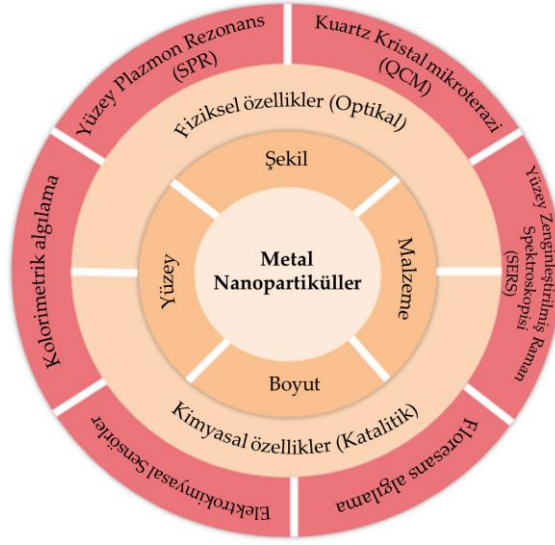
Altın (Au), gümüş (Ag), ve bakır (Cu) biyoetiketleme, kataliz, fotoğrafçılık, optoelektronik, fotonik ve yüzey zenginleştirilmiş Raman saçılması (SERS) tespiti gibi faydalı alanlar için kararlı nanopartiküllerin dispersiyon sentezi için yaygın olarak kullanılmaktadır. UV-görünür bölgede metal nanopartiküller ayrıca yüzey plazmon rezonans emilimine de sahiptir. Dahası fonksiyonellenen, biyoyumlu ve inert nanomalzemeler kaser teşhisi ve tedavisinde antikanser ilaçların salınımı için de kullanılmaktadır. Genel olarak metal nanopartiküller kimyasal ve fiziksel metodlarla tasarlanabilir ve stabilize edilebilir. Bu nedenle, ilaç salınım araçlarının yanında görüntüleme ajanları ve biyosensörler olarak artan bir şekilde kullanılan bu yapılar “yeni” akıllı malzemeler olarak düşünülebilir. Bu yeni malzemeler ile son gelişmeleri geleneksel tanıma tekniklerinin bazı kısıtlamalarını aşmasını sağlayan güçlü, yüksek derecede hassas ve seçici tayin metotların gelişmesini sağlayabilir. Analitlerin yüksek duyarlılık ve seçicilikte hızlı tayini için sensör teknolojisi bazı engellemelere sahiptir. Nanoteknoloji mevcut sensör teknolojisinde önemli bir rol oynar (Şekil 2.12.) Cu, Au, Ag gibi metalnanopartiküller kolorimetrik, fluometrik, yüzey zenginleştirilmiş Raman saçılması, yüzey plazmon rezonans gibi bilinen optikal karakterlerinden dolayı optik temelli tayinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır.

Metalik nanoparçacıkların fizikokimyasal özellikleri

Sensör cihazları ve biyomedikal uygulamalar için kullanılan birkaç soy metal nanopartikül vardır. Bununla birlikte, altın nanopartiküller çoğunlukla;

- Biyoyumluluk ve kimyasal inertlik;
- Tiyol bağlantıları yoluyla nispeten basit üretim ve modifikasyon;
- Biyomoleküller için kararlı bir immobilizasyon platformu sağlayan yüksek yüzey enerjisi;
- Elektromanyetik bir alanın metal partiküllerle etkileşimi ile indüklenen malzemenin iletken elektronlarının (plazmonlar) toplu salınımı nedeniyle dikkat çekici optik özellikleri;

Elektronik özellikler (elektrotlar ve çok sayıda moleküller arasındaki elektron transferinin artırılması) ve katalitik özellikler (Ahmad ve ark., 2015).



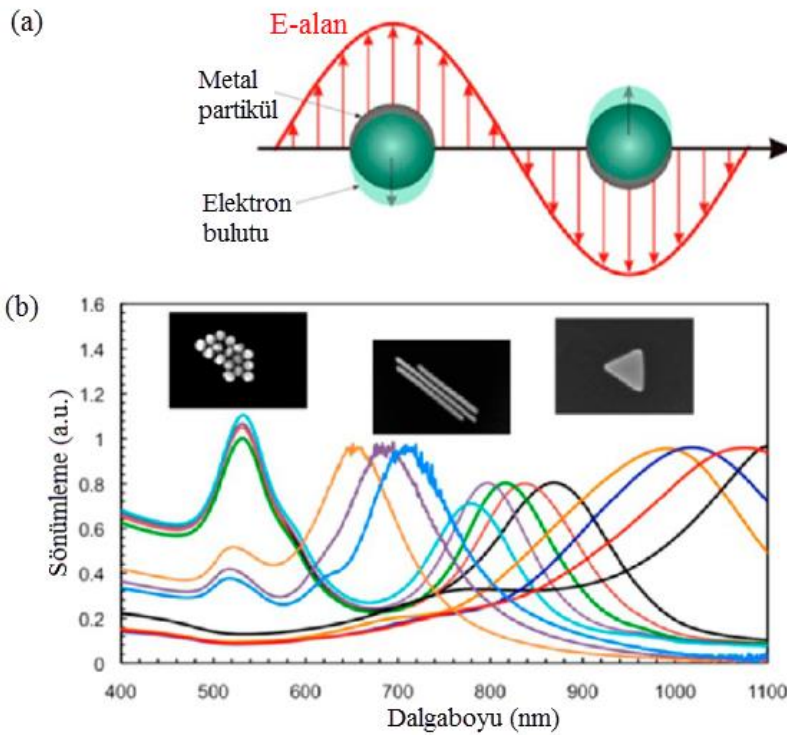
Şekil 2.12. Metal nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin şematik gösterimi ve algılama alanlarındaki uygulamaları.

2.7.1. Altın Nanopartiküller

Altın nanopartiküller (AuNPs) birçok yüzey fonksiyonelliği ve özelliklerinden dolayı genellikle nanobiyoteknolojide kullanılmaktadır. Çeşitli nano yapılar arasında AuNP'ler önemli özellikleri nedeniyle, çeşitli bilim alanlarında büyük ilgi görmüştür: fizikokimyasal kontrolü, sentetik manipülasyon kolaylığı, yüksek X-ışını emme katsayısı, tiyollere, aminlere ve disüfitlere güçlü bağlanma afinitesi, benzersiz kontrol edilebilir optik ve farklı elektronik özellikleri gibi. AuNP'lerin spesifik fiziksel ve kimyasal özellikleri ilaç salınımı, terapötikler, biyo-etiketleme, kimyasal ve biyolojik algılama, tayin ve teşhis, lineer olmayan optik, görüntüleme, kataliz ve alanlarda onları çeşitli uygulamalar için olağanüstü araçlar yapar. AuNP'lerin büyük yüzey/hacim oranı, şekle bağlı optoelektronik özellikleri, düşük toksisite ve mükemmel biyoyumluluk gibi bu etkili özellikleri onları biyoteknolojide seçkin malzemeler yapmaktadır (Yin, Li, Ma, & Liu, 2017; Elahi, Kamali, & Baghersad, 2018). AuNP'lerin SPR bantları onların fizyolojik ve morfolojik (şekil, yüzey, çözücü, ligand, çekirdek yükü, sıcaklık) önemli fiziksel özelliklerine bağlıdır.

2.7.2. Altın Nanopartikül Temelli Optik Sensörler

Metalik nanopartiküllerin (özellikle altın, gümüş, bakır) optik özellikleri, partikül yüzeyinde lokal yüzey plazmonu (LSP) modlarının uyarılmasından kaynaklanmaktadır. Genel olarak UV'den infrared spektral alana kadar değişen elektromanyetik dalgalar tarafından uyarılan LSP modları, partikül yüzeyinde iletken bant elektronlarının kolektif salınımlarının sonucudur. LSP'lerin uyarılması, Şekil 2.13(b)'de gösterildiği gibi görünür ve yakın kızılötesi aralıkta gelişmiş sönme (emme ve saçılma) bantlarının ortaya çıkmasına neden olur. LSP modları, nanopartikülün boyut ve şekline, metalin kimyasal doğasına ve yerel çevre ortamına güçlü bir şekilde bağlıdır. LSPR'nin bu çevresel bağımlılığı, tanıma olayının frekansında tespit edilebilir bir değişikliklikle sonuçlanabileceği için analiz için büyük bir avantaj sunar (Guo, 2012; Ahmad ve ark., 2015).



Şekil 2.13. (a) Küresel bir nanopartikül üzerinde yüzey plazmon rezonans uyarımı; (b) Farklı şekil ve boyutlarda AuNP'lerin UV-vis-NIR spektrumları (Qiu ve Wei, 2014).

Bu olağanüstü optik özellikler, AuNP'lerin (biyo)algılama, ikinci harmonik üretim veya yüzeyi zenginleştirilmiş spektroskopiler (SERS, yüzey zenginleştirilmiş floresans) için kullanımıyla ilgili birçok araştırmaya teşvik etmiştir. Altın nanopartiküller, iyi bilinen yüzey plazmon rezonans (SPR) transdüksiyonunu kullanarak (bio)analizde avantajlarını

da göstermiştir. SPR yöntemi genellikle, yüzey plazmonlarının ortamının dielektrik sabitinin, altın film/dielektrik ara yüzünde dielektrik sabitinin değişimini temel alır; buradaki analit tespiti, yansıyan ışık açısının, yoğunluğunun veya fazın değişmesi gibi farklı şekillerde kaydedilebilir. Altın film yerine saf altın nanopartikül temelli bir SPR transdüksiyonunun (dönüştürücü) kullanılmasının yanı sıra, altın filmler ve altın nanopartiküller sandviç bir konfigürasyonda kullanıldığında, SPR sinyalinde önemli bir artış elde edilebilir. Aslında, LSP modunun altın nanopartiküller üzerine uyarılması, altın film/dielektrik ara yüzünde evansans alanının bozulmasına neden olur ve immobilize (biyo)reseptör ünitesi ile tanınan analit arasındaki etkileşimin tayin edilmesini geliştirir (Guo, 2012; Ahmad ve ark., 2015).

Altın nanopartiküller (AuNP'ler), biyoloji, kataliz, elektronik ve plazmonik gibi birçok alanda olağanüstü özellikleri ve potansiyel uygulamaları nedeniyle son on yılda kapsamlı araştırmalara konu olmuştur. 1-100 nm çapındaki AuNP'ler, reaktivitelerini koruyarak (biyo)moleküller için kararlı bir immobilizasyon platformu sağlayan yüksek yüzey-hacim oranına ve yüksek yüzey enerjisine sahiptir (Li, Schluesener, & Xu, 2010; Holzinger, Goff, & Cosnier, 2014;).

Çizelge 2.9. Altın nanopartikül temelli sensörler.

Sensör özellikleri	AuNP'ler tarafından kazanılan özellikler	Kaynak
optik özelliklerde yapılan değişikliklere dayanan optik sensörler	kırılma indisi değişikliklerinin amplifikasyonu	(Guo, 2012)
elektriksel özelliklerdeki değişikliklere dayanan elektrokimyasal sensörler	elektron transferinde artış; gelişmiş yüzey alanı; kataliz	(Daniel & Astruc, 2004)
kütle değişimlerine dayanan gravimetrik sensörler	kütle değişikliklerinin artırılması; iyileştirilmiş yüzey alanı	(Zhou, O'Shea, & Li, 2000)

Literatürde (biyo)sensörlerdeki uygulama için kullanılan tanıma sistemleri arasında, moleküler baskılanmış polimerler, son yıllarda ilgi çeken hedef molekülleri seçici olarak tanıyabilen ve bağlayabilen sentetik analite özel reseptörler oldukları için, bu ilgi alanlarına geniş bir ilgi alanı uyandırmıştır. Diğer tanıma sistemleri ile karşılaştırıldığında, moleküler baskılanmış polimerler düşük maliyetli ve kolay sentezlenmesi, zor kimyasal ve fiziksel koşullara karşı yüksek kararlılık ve mükemmel tekrar kullanılabilirlik gibi birçok değerli figüre sahiptir. Moleküler baskılama

tekniklerinde, fonksiyonel monomerler ilk önce çok değerlikli bir analitin çevresinde önceden düzenlenir, çapraz bağlı monomerlerle kopolimerize edilir ve analitin uzaklaştırılmasından sonra polimer, analitin yüksek özgüllükle yeniden bağlanması için tamamlayıcı bağlanma yerleri içermektedir. MIP temelli sensörlerin geliştirilmesi için önemli bir engel, tanıma olayını analitik bir sinyale dönüştürmede başarılı olmaktır. Bu, yeni elektronik veya optik dönüştürücü formları sağlamak için MIP'leri NP'lerle birleştiren hibrit sistemlerin detaylandırılmasıyla gerçekleştirilebilir. Sonuçta elde edilen nanokompozitler, yüksek spesifik alan, üstün mekanik özellikler, elektrik iletkenliği veya optik özellikler gibi gelişmiş kimyasal ve fiziksel özellikler sunarak hassasiyetlerini ve özgüllüklerini geliştirir.

MIP düşük tayin limitleri avantaj sağlar, ancak kalıp molekül sızıntısı, düşük bağlama kapasitesi ve çözeltide zayıf algılama MIP'in olası sınırlamalarıdır (Malekzad ve ark., 2018). Hassas ve spesifik sensörlerin geliştirilmesi için altın nanopartiküllerin ve MIP'lerin kombinasyonuna odaklanan son çalışmalar oldukça ilgi çekmektedir. Bu, AuNP'lerin MIP'lerle nanokompozitlerini (i) ince kompozit filmler veya (ii) koloidal kompozit parçacıklar şeklinde tasarlanarak yeni sensör sistemlerin geliştirmesine olanak sağlamaktadır.

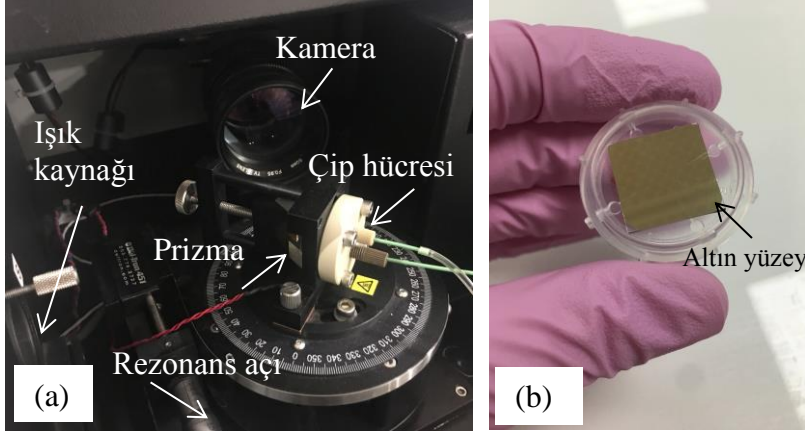
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Aflastandard, Aflatoksin B1 (AFB1), Aflatoksin M1 (AFM1), Okratoksin A (OTA) ve Sitrinin (CIT) R-Biopharm Rhone (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir. Tri-sodyum sitrat dihidrat, altın(III) klorür trihidrat, tween 20, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) and 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), etanol, hidrojen peroksit, azobisisobutironitril (AIBN) Merck A.G. (Germany) firmasından temin edilmiştir ve potasyum klorür (KCl), sodyum klorür (NaCl), sülfürik asit, asetik asit Fluka A.G. (Buchs, Switzerland) firmasından alınmıştır. SPR sensör sistemi için denge tamponu fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) pH 7.4 kullanılmıştır, PBS tamponu 0.01 M Na_2HPO_4 , 0.0027 M KCl, 0.002 M KH_2PO_4 ve 0.137 M NaCl içermektedir. Deneyleerde kullanılacak cam malzemeler bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiştir. Deneyleerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 M Ω /cm'dir.

3.2. Optik Sistem

Optik temelli yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör sistemi için SPR imager II (GWC Technologies, WI, USA) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.1.(a)). SPRchip™ altın sensor çip SPRImager®II GWC Technologies firmasından temin edilmiştir ve altın çip 1 mm x 18 mm x 18 mm boyutlarında, altın yüzey kalınlığı ~50 nm'dir (Şekil 3.1.(b)). Sistemin lazer ışık kaynağı Quartz Halogen Lamps (6 volts 10 watt 2000 H), (4mm base) (Katalog No. L6402, International Light Technologies, Peabody, MA, USA) kullanılmaktadır. SF10 equilateral prizma (GWC Technologies WI, USA) kullanılmıştır. Prizma fisherbrand lens kâğıdı 4" x 6" (Katalog No: 11-996, Fisher Scientific, USA) kullanılarak temizlenmiştir.



Şekil 3.1. (a) Yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör sistemi; ve (b) SPR çip.

3.3. Altın Nanopartiküllerin Sentezi

Altın nanopartiküllerin (AuNPs) sentezi şu şekildedir; öncelikle 5 mL saf suda 8.5 mg altın(III)klorür trihidrat “ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ” çözülmüştür. Daha sonra manyetik karıştırıcı ısıtıcı sisteminde 95 mL kaynayan saf suya bu çözelti eklenmiştir. 12 mL %1 (v/v) sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) çözeltisi kaynatıldıktan sonra bu karışıma eklenmiştir. Karıştırma işlemi devam ederken renk değişimi koyu kırmızı olarak gözlenmiştir. Karışımın son hacmi 100 mL’ye tamamlanmıştır (Sener, Uzun, & Denizli, 2014).

3.3.1. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutu ve morfolojisi zeta-sizer ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile karakterize edilmiştir.

3.3.1.1. Boyut Analizi

Sentezlenen altın nanopartikülün boyut analizi, Nano Zeta-sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) cihazı ile belirlenmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapan partiküllerin hidrodinamik boyutu (0.6 nm-6.0 μm aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik 200 mS) ve molekül ağırlığının (1×10^3 - 2×10^7 aralığında) tayinine olanak sağlayan bir sistemdir. Zeta boyut analizi için izlenen deneysel yöntem şu şekildedir; partikül çözeltisi (0.5 mL) boyut analizörünün örnek yuvasına yerleştirilmiştir. Işık saçılması 90° ’lik geliş açısında 25°C ’de tayin

edilmiştir. Veri analizi için, deiyonize suyun yoğunluğu (0.88 mPa.s) ve kırılma indeksi (1.33) kullanılmıştır. Işık saçılma sinyali partikül sayısı (partikül sayısı/s) olarak hesaplanmıştır. Örnekteki nanopartikül yoğunluğu yeterli yoğunluktadır. Ölçümler 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar zeta boyut analizörünün yazılımı ile incelenmiş ve standart sapma değerleri ile birlikte rapor edilmiştir.

3.3.1.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu

Sentezlenen altın nanopartiküllerin yüzey morfolojisi transmisyon (geçirimli) elektron mikroskobu (TEM) (Zeiss Evo 40) ile incelenmiştir. Elektron kaynağı tungsten filament gerilimi 500V-30kV ve dedektörleri SE, BSE, EDX, VPSE'dir. Çapları 9-15 nm arasında kalınlıkları 0,1-30 nm arasında olan iletken katı veya toz numuneler incelenebilir.

3.4. N-metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) Monomerinin Sentezi

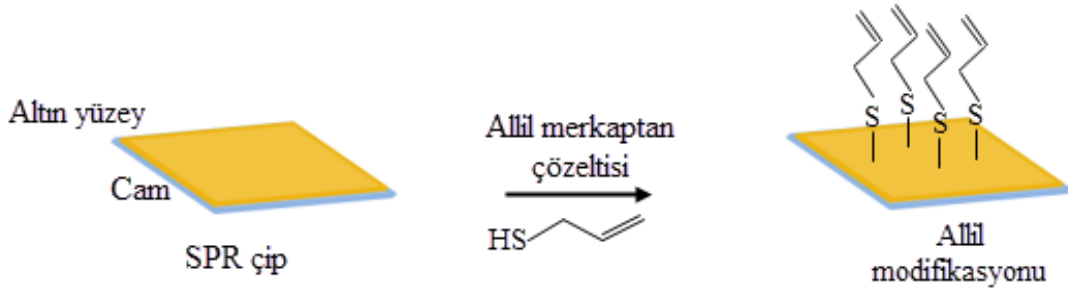
Aflatoksin ile ikincil etkileşimleri sağlamak için N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) fonksiyonel monomeri kullanılmıştır. Monomerin sentezlenmesinde izlenen yol şu şekildedir; 30 mL potasyum karbonat çözeltisi (% 5) hazırlanmıştır ve bu çözeltiliye L-fenilalanin metil ester ve sodyum nitrit eklenmiştir daha sonra karışım 0°C'ye soğutulmuştur. Azot atmosferinde, metakriloil klorür bu çözeltiliye eklenmiştir ve karışım manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırılmıştır. Son olarak karışım pH, 7.0'ye ayarlandıktan sonra döner bir buharlaştırıcı sistemde sulu faz buharlaştırılmıştır. Sentezlenen MAPA'nın kimyasal yapısı NMR analizi ile belirlenmiştir.

3.5. Aflatoksin Baskılanmış Çiplerin Hazırlanması

3.5.1. SPR Çip Yüzeyinin Modifikasyonu

Aflatoksin baskılanmış polimer film SPR çip yüzeyine kaplanmadan önce SPR çip altın yüzeyi sıcak asidik pirana çözeltisi (3:1 H₂SO₄:H₂O₂, v/v) ile temizlenmiştir. Asidik pirana çözeltisi altın yüzeyde 20 saniye bekletilmiştir. Sensör çipler, deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve etüvde (40°C) 3 saat kurutulmuştur. Allil merkaptan (CH₂=CHCH₂SH) çözeltisi allil grubu modifikasyonu için tercih edilmiştir. Temizlenen

altın çip yüzeyine 10 µL damlatılmıştır ve bir gece boyu yüzeyde allil grupların bağlanması için bekletilmiştir (Şekil 3.2).

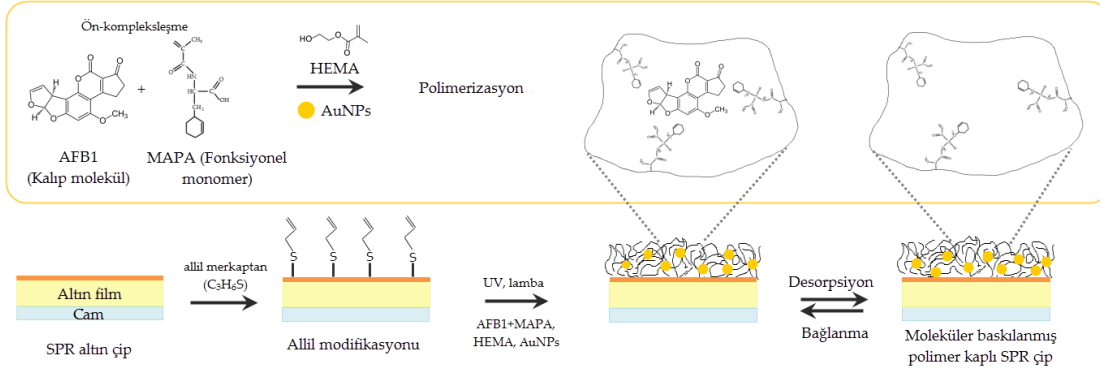


Şekil 3.2. SPR çip yüzeyinin allil merkaptan çözeltisi ile allil modifikasyonunun şematik gösterimi.

3.5.2. AFB1 Baskılanmış SPR Çipin Hazırlanması

AFB1 baskılanmış SPR sensör çiplerin tasarlanması için aşağıdaki yol izlenmiştir; AFB1, N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) monomeri ile koordine edilerek AFB1-MAPA ön kompleksi oluşturulmuştur; (ii) ön-kompleks karışımına EGDMA monomeri ve AuNP'ler ilave edilmiştir; (iii) monomer karışımına polimer başlatıcısı AIBN eklenmiştir; (iv) son karışım allil grupları modifiye edilmiş çip yüzeyine damlatılmıştır; (v) çip yüzeyinde polimer film oluşması için UV lamba altında polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir; (vi) hedef molekül AFB1 polimer filmde desorpsiyon ajanı kullanılarak uzaklaştırılmıştır.

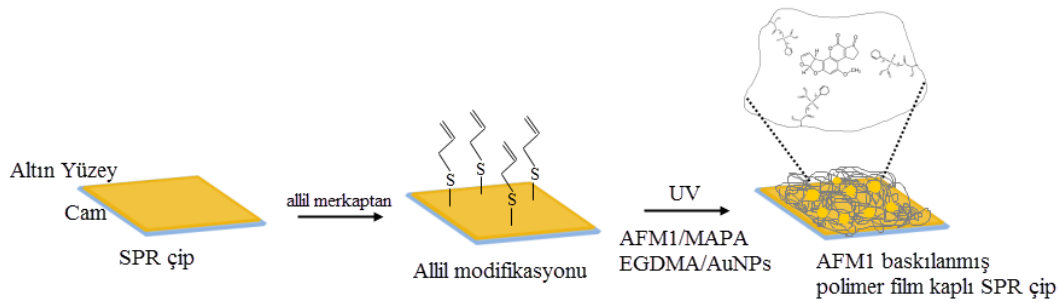
2:1 µmoL oranında AFB1:MAPA fonksiyonel monomer ön-kompleksi hazırlanmıştır. AFB1 ile ikincil etkileşimler için fonksiyonel monomer olarak MAPA monomeri kullanılmıştır. Ön kompleks daha sonra 2 µmoL çapraz bağlayıcı (EGDMA), 1 µmoL monomer (HEMA) ve 2 µmoL AuNP ile 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra başlatıcı (AIBN) monomer karışımına ilave edilmiştir. Allil merkaptan ile modifiye edilen SPR çip altın yüzeyine polimer çözeltisi damlatılmıştır (10 µL). Tozsuz ortamda UV lamba (UVP, Cambridge, UK) altında (365 nm, 100 W) 37°C'de 30 dakika boyunca polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Black-Ray B-100AP High Intensity UV Lamb). Polimer kaplanmış SPR çip yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve etüvde (40°C) kurutulmuştur.



Şekil 3.3. Aflatoksin B1 baskılanmış çiplerin tasarımının şematik diyagramı.

3.5.3. AFM1 Baskılanmış SPR Çipin Hazırlanması

AFM1 baskılanmış SPR sensör çiplerin tasarlanması için aşağıdaki yol izlenmiştir; AFM1, N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) monomeri ile koordine edilerek AFM1-MAPA ön kompleksi oluşturulmuştur; (ii) ön-kompleks karışımına EGDMA monomeri ve AuNP'ler ilave edilmiştir; (iii) monomer karışımına polimer başlatıcısı AIBN eklenmiştir; (iv) son karışım allil grupları modifiye edilmiş çip yüzeyine damlatılmıştır; (v) çip yüzeyinde polimer film oluşması için UV lamba altında polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir; (vi) hedef molekül AFM1 polimer filmde desorpsiyon ajanı kullanılarak uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.4. Aflatoksin M1 baskılanmış çiplerin tasarımının şematik diyagramı.

2:1 μmol oranında AFM1:MAPA fonksiyonel monomer ön-kompleksi hazırlanmıştır. AFM1 ile ikincil etkileşimler için fonksiyonel monomer olarak MAPA monomeri kullanılmıştır. Ön kompleks daha sonra 2 μmol çapraz bağlayıcı (EGDMA), 1 μmol monomer (HEMA) ve 2 μmol AuNP ile 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra başlatıcı

(AIBN) monomer karışımına ilave edilmiştir. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip altın yüzeyine polimer çözeltisi damlatılmıştır (10 µL). Tozsuz ortamda UV lamba (UVP, Cambridge, UK) altında (365 nm, 100 W) 37°C’de 30 dakika polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Black-Ray B-100AP High Intensity UV Lamb). Polimer kaplanmış SPR çip yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve etüvde (40°C) kurutulmuştur.

3.5.4. Kalıp Moleküllerin Desorpsiyonu

Kalıp molekülleri AFM1 ve AFB1’in polimerik yapıdan sökülebilmesi için ikincil etkileşimleri kırabilecek bir desorpsiyon ajanının kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla desorpsiyon ajanı olarak 8:1:1 hacim oranında PBS/Metanol/HAc çözeltisi kullanılmıştır. AFM1 ve AFB1 baskılanmış polimer film kaplı çipler desorpsiyon çözeltisi (20 mL) içerisinde çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanmıştır (100 rpm). Desorbe edilen sensör çipler, deiyonize su ile yıkanmış ve etüvde (25°C) kurutulmuştur.

3.5.5. Baskılanmamış Çiplerin Hazırlanması

Aflatoksin baskılanmamış (NIP) sensör çip kalıp molekül olmadan hazırlanmıştır. HEMA ve MAPA monomeri varlığında polimer çözeltisi hazırlanmıştır. Polimer çözeltisine 2 mg AIBN başlatıcı eklenmiştir. Allil merkaptan ile modifiye edilen SPR çip altın yüzeyine polimer çözeltisi damlatılmıştır (10 µL). Tozsuz ortamda UV lamba (UVP, Cambridge, UK) altında (365 nm, 100 W) 37°C’de 30 dakika polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Black-Ray B-100AP High Intensity UV Lamb). Polimer kaplanmış SPR çip yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve etüvde (40°C) kurutulmuştur.

3.6. SPR Nanosensör Çiplerinin Karakterizasyonu

Modifiye edilmemiş çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş çip, AFM1 baskılanmış (AFM1-MIP), AFB1 baskılanmış (AFB1-MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR çiplerinin karakterizasyon çalışmaları FTIR-ATR, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), temas açısı

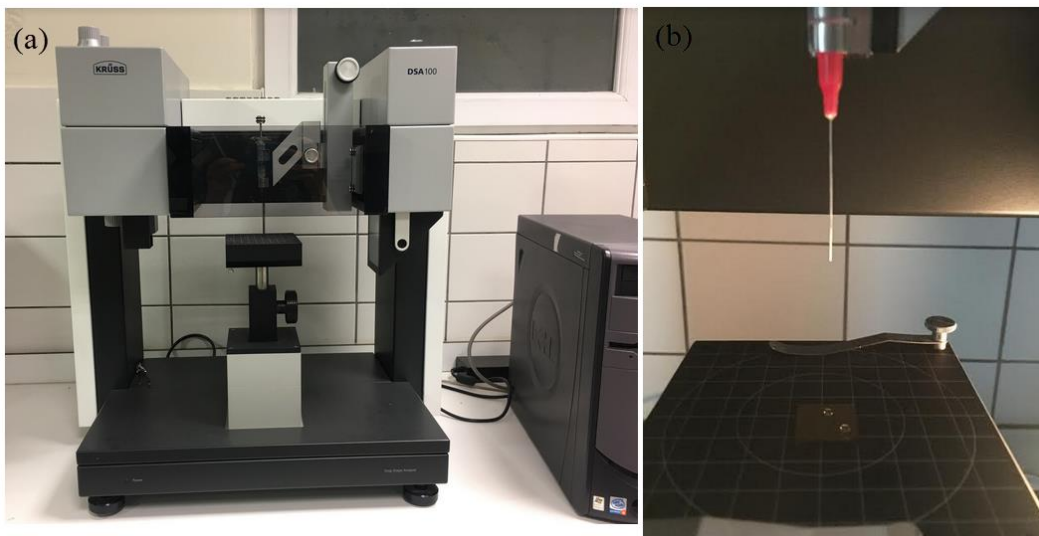
(CA) taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve elipsometre cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.6.1. FTIR-ATR

AFB1 ve AFM1 baskılanmış çip yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (ThermoFisherScientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Çipler cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür. AFB1 ve AFM1 baskılanmış çiplerin FTIR-ATR spektrumları kaydedilmiştir.

3.6.2. Temas Açısı

Tasarlanan çip yüzey hidrofilitesi temas açısı ile analiz edilmiştir. Temas açısı ölçümleri için KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Cihaz konfigürasyonu şunları içerir: mikroskop optiği, yüksek çözünürlüklü yüksek hızlı kamera, lens, şırıngalar, kapalı mahfazadaki odaklama ve kontrol elemanları (Şekil 3.5 (a)). PP luer-lock konektörlü paslanmaz çelik iğne (\varnothing , 0,5 mm) tek kullanımlık bir şırınga (hacim, 1 mL) ile kullanılmıştır (Şekil 3.5 (b)). Yüzey gerilimi ve sıvı-sıvı arayüzey gerilimi Sessile Drop yöntemi kullanılarak ölçülmüştür ve SPR çiplerin ortalama temas açısı değerleri hesaplanmıştır.

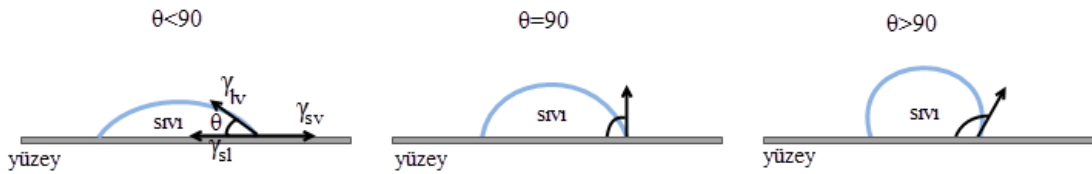


Şekil 3.5. (a) Temas açısı ölçümleri için kullanılan KRÜSS DSA100 cihazı; (b) iğne.

Modifiye edilmiş SPR çip yüzeyinin yüzey hidrofilikliğı için temas açısı analizi yapılmıştır. Bir sıvı ile katı bir yüzey (örneğin, çip yüzeyi) arasındaki temas açısı, bir temas açısı cihazı ile analiz edilmiştir. Katı yüzey ile sıvı arasında bir teğet (θ , açı) oluşmaktadır. Temas temelli katı yüzey gerilimlerini belirleme olasılığı, 1805'te Young tarafından tanımlanmıştır. Katı bir yüzey üzerindeki bir sıvı damlasının temas açısı, üç arayüzey geriliminin etkisi altında, damlanın mekanik dengesi ile tanımlanmıştır (Şekil 3.6). Bu ara yüzey gerilimleri katı-sıvı γ_{sl} , katı-buhar γ_{sv} ve sıvı-buhar γ_{lv} 'dir. Bu mekanik denge bağıntısı Young eşitliğidir:

$$\gamma_{lv}\cos\theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad (3.1.)$$

θ_Y , Young temas açısıdır (Kwok & Neumann, 1999). 90° 'nin altındaki bir temas açısı, katı yüzeyin ıslanmasının uygun olduğunu ve katı yüzey üzerinde geniş bir alana yayılan bir sıvının olduğunu gösterir. 90° 'den büyük bir temas açısı genellikle katı yüzeyin ıslanmasının elverişsiz olduğunu ve bir sıvının yüzey ile temasını azaltıp kompakt bir sıvı damlası oluşturduğunu gösterir (Yuan & Lee, 2013).



Şekil 3.6. Düzgün homojen katı bir yüzeye sessile drop sıvı ile oluşan temas açılarının şematik gösterimi.

SPR çiplerin polimer kaplı altın yüzeyine bir damla su damlatılarak yapışık damla (Sessile Drop) yöntemiyle temas açısı belirlenmiştir. Çip altın yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatılarak üç farklı fotoğraf çekilmiş ve her biri için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Belirlenen temas açısı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki noktanın ortalaması olan ortalama temas açısı değerleri

elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş ve polimer film kaplı SPR çip yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan üç ölçümün ortalama değerleri ile hesaplanmıştır.

3.6.3. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) yüzeyin yüksek çözünürlükte taranmasını sağlamaktadır. AFM, katı yüzeylerin topografisini yüksek çözünürlükte görüntülemek için kullanılır. Aynı zamanda kuvvet-mesafe eğrilerini ölçmek için de kullanılabilir (Butt, Cappella, & Kappl, 2005). Hazırlanan SPR çiplerin yüzey topografisi karakterizasyonları için atomik kuvvet mikroskobu (AFM, Park System, XE-100E, Korea) kullanılmıştır. Bu amaçla polimer film kaplı SPR çiplerin ve modifiye edilmemiş SPR çiplerin yüzey analizleri non-contact modda yapılmıştır. Farklı ölçeklerde yüzey görüntüsü ve 3D görüntüleri alınmıştır.

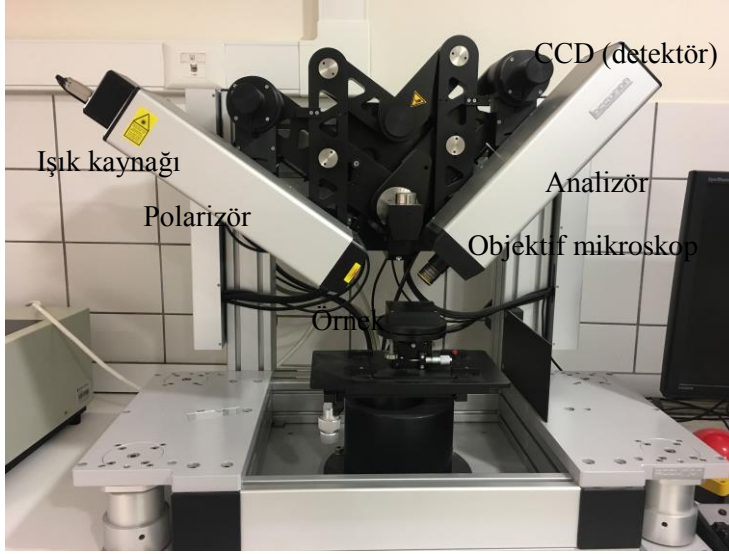
3.6.4. Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM)

Hazırlanan AFB1 ve AFM1 baskılanmış ve baskılanmamış polimer film çip yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopi QUANTA 400F Field Emission cihazıyla incelenmiştir. Örneğin analize hazırlanması: Öncelikle stub üzerine çift taraflı karbon bant yapıştırılarak morfolojisi incelenecek numunenin uygun tarafı bu bant ile stub üzerine sabitlenmiştir. Üzerinde numune bulunan stublar numune tutucuya vidalanarak tutturuldu. Sonrasında numunenin SEM incelemesini yapabilmesi için yeterli iletkenliğe sahip olması amacıyla altın kaplama yapılmıştır (Quorum, Q150R, İngiltere). Örneklerin SEM görüntülerinin alınması: Cihaza yerleştirilen numune tutucu üzerindeki numunelerin görüntüleri uygun büyütme ve voltaj altında alınmıştır. SPR çiplerin polimer kaplı yüzey görüntüleri ve enine kesit görüntüleri alınarak çip yüzey modifikasyonunun başarılı bir şekilde tasarlandığı görülmüştür.

3.6.5. Elipsometre

Hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış SPR çiplerin ortalama yüzey kalınlık ölçümleri Nanofilm-EP3Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Lazer ışını doğrusal bir polarizörden (P) ve çeyrek dalga plakasından geçtikten sonra eliptik olarak polarize edilir. Eliptik olarak polarize edilmiş

ışık daha sonra numuneden bir analizöre yansıtılır ve uzun bir çalışma mesafesi objektifinden bir CCD kamera üzerinde görüntülenir (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Elipsometre cihazı.

Işık kaynağı 532 nm dalga boyu ve 62°'lik bir insidans açısı ile en yüksek görüntü kalitesi için geniş bantlı bir lazerdir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda 62°'lik geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Çip yüzey kalınlık analizinde, yaklaşık 50 µm×50 µm örnek alanını entegre eden dört bölgeyi bir otomatik sıfırlama yöntemi algoritması ile izlenmiştir. SPR çip lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiş ve yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 prizma +50 nm altın +50 nm polimer katmanı veri olarak öngörülerek sensör yüzeyinde 6 farklı noktada ölçüm yapılmıştır. Ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir.

3.7. AFM1 ve AFB1 Tayini

Aflatoksin baskılanmış SPR çiplerin (AFB1-MIP ve AFM1-MIP) hazırlanmasından sonra AFM1 ve AFB1 tayini için kinetik çalışmalara geçilmiştir. SPR imager II sensör sistemi kinetik çalışmalarda kullanılmıştır. Kinetik çalışmalar, geniş derişim aralığında AFM1 ve AFB1 çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. AFB1 çözeltileri pH 7.4 PBS tamponuyla 10.0-0.0001 ng.mL⁻¹ arasında hazırlanarak SPR sensör sistemine verilmiştir. AFM1 çözeltileri pH 7.4 PBS-Tween20 (%0.05) tamponuyla 10.0-0.0001 ng.mL⁻¹ arasında hazırlanarak SPR sensör sistemine verilmiştir. Aflatoksin baskılanmış

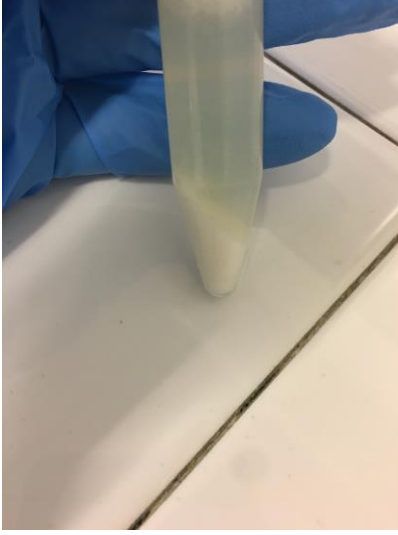
ve baskılanmamış polimer film kaplı SPR çipler, kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. Bu başlık altında uygulanan deneysel işlem şu şekildedir: SPR çip yüzeyi deiyonize su (30 mL) ile yıkanmıştır. Daha sonra AFM1-baskılanmış ve AFB1-baskılanmış çip, PBS tamponuyla (pH 7.4) oda sıcaklığında dengelenmiş ve plazmon rezonans açısı belirlenmiştir. Sabit bir rezonans açısı, SPR-dip kısmının sol açısı kanadında manuel olarak ayarlanmaktadır. Daha sonra SPR sisteminden üç dakika süreyle PBS tamponu (pH: 7.4) geçirilmiştir. Bu dengeleme basamağının ardından farklı derişimlerdeki aflatoksin çözeltileri teker teker (3.0 mL, 0.5 mL/dak akış hızı) sisteme verilmiştir. Kırılma indisindeki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 5 dak) sisteme 8:1:1 PBS/Metanol/HAc çözeltisi (10 mL, 0.5 mL/dak akış hızı) verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, SPR sensör sistemi su ve PBS tamponu ile tekrar yıkanarak dengelenmiştir. Farklı derişimlerdeki aflatoksin çözeltileri sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlanmıştır. Bu SPR sensör sisteminde, birincil SPR yanıtı PIU'dur (Piksel Yoğunluk Birimi; Pixel Intensity Unit). PIU'da elde edilen SPR sinyal değişimi yansıtmadaki gerçek değişime, $\Delta R\%$ dönüştürülmüştür. SPR sensör sinyal yanıtı, sağlanan yüzey kapsamının $\Delta R \leq 10\%$ doğrusal bir fonksiyonudur.

3.8. Gıda Örneklerinde Aflatoksin M1 Tayini

AFM1'in süt örneklerinde tayini uygulanması için işlenmemiş süt kaynağı kullanılmıştır. Çiğ süt örneklerine eklenen farklı AFM1 derişimleri SPR sensör sistemine verilmiştir ve AFM1 tayini gerçekleştirilmiştir. Geniş derişim aralığında tayin edilen AFM1 sinyal değerleri karşılaştırılarak tasarlanan AFM1 baskılanmış çipin kararlılığı değerlendirilmiştir.

3.8.1. Süt Örneklerinin Hazırlanması

İşlem görmemiş çiğ süt numunesinden 5 mL alınıp bir behere aktarılmıştır. Buzdolabında +4°C'de bekletilmiştir; inkübasyon süresi 30 dakikadır. Daha sonra süt örneği santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 3500 rpm 10 dak santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı toplanmış ve metanol ile seyreltilmiştir (Zheng ve ark., 2013).



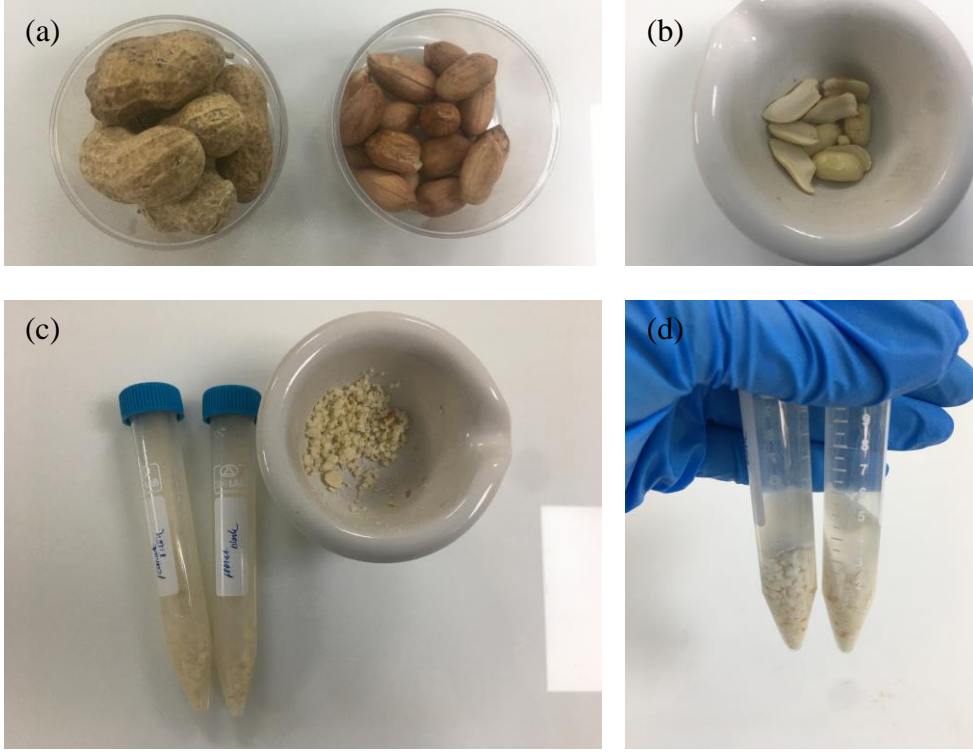
Şekil 3.8. Süt örneği görüntüsü.

3.9. Gıda Örneklerinde AFB1 Tayini

AFB1'in tayini kuru gıda örneklerinde (fıstık, mısır) uygulanmıştır. Bu örneklerle eklenen farklı AFB1 derişimleri SPR sensör sistemine verilmiştir ve AFB1 tayini gerçekleştirilmiştir. Geniş derişim aralığında tayin edilen AFB1 sinyal değerleri karşılaştırılarak tasarlanan AFB1 baskılanmış nanosensörün kararlılığı değerlendirilmiştir.

3.9.1. Fıstık Örneklerinin Hazırlanması

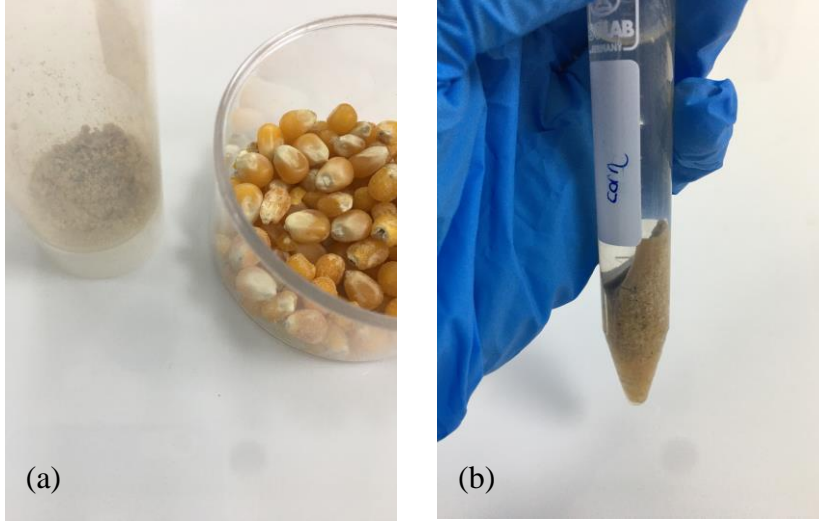
Rastgele bir pazardan satın alınan taze fıstık örnekleri havanda öğütülmüştür. Bir santrifüj tüpüne 15 mL metanol-su (80:20 v/v) ve 5 g fıstık örneği ilave edilmiştir. Örneklerin ekstraksiyonu için 100 dak boyunca çalkalanmıştır, ardından oda sıcaklığında 3500 rpm'de 10 dak santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir (Sabet ve ark., 2017). 1.0 mL süpernatant bir tüpe aktarıldı ve PBS tamponu ile seyreltildi ve farklı derişimlerde AFB1 ile kirletilmiş numuneler AFB1-MIP nanosensörü ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.9. Taze fıstık örneklerinin görüntüleri; (a) taze fıstık; (b) fıstık örnekleri; (c) öğütülmüş fıstık; (d) santrifüj edilen fıstık örnekleri.

3.9.2. Mısır Örneklerinin Hazırlanması

Rastgele bir marketten alınan mısır örnekleri öğütülmesi için homojenizasyon yapılmıştır. 5.0 gram öğütülmüş mısır numunesine 10 ng.mL^{-1} AFB1 eklenmiştir. Daha sonra bu karışıma 10 mL %80 Metanol:H₂O çözeltisi eklenerek 30 dakika boyunca çalkalanmıştır. Son olarak 6000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. AFB1 tayini için toplanan süpernatant kısmı PBS tamponu ile % 20 (v/v) metanol olacak şekilde seyreltilmiştir (Shim ve ark, 2014).



Şekil 3.10. Mısır örneklerinin görüntüleri; (a) öğütülmüş mısır; (b) santrifüj edilen mısır örneği.

3.10. Seçicilik Çalışmaları

Seçici tanıma kapasitesi algılama analizleri için önemlidir (Gu ve ark., 2019). Moleküler baskılanmış polimerler mükemmel özellik gösterirler ve spesifik hedeflere bağlanırlar. Aflatoksin baskılanmış nanosensörlerin seçiciliklerinin belirlenmesi için diğer mikotoksinler okratoksin A (OTA) ve sitrinin (CIT) kullanılmıştır.

Diğer mikotoksinler için AFB1 ve AFM1'e göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$K_d = \frac{(C_i - C_f)}{C_f} \times \frac{V}{m} \quad (3.2.)$$

Eşitlikte K_d , dağılma katsayısını (mL.g^{-1}); C_i ve C_f , mikotoksinlerin başlangıç ve final derişimleri (ng.mL^{-1}); V , aflatoksin çözelti hacmi (mL) ve m , polimerin ağırlığı (g) ile ifade edilmiştir. SPR nanosensörü uygulamaları, derişim ve kütle parametreleri değiştirilir, çünkü aflatoksin çözeltilerinin başlangıç ve final derişimleri arasında önemli bir fark yoktur. Polimer filmin kütlesi, bu sensör sisteminde tam olarak tespit edilemez (Yılmaz ve ark., 2017). Bu nedenle, seçicilik katsayısı k , aşağıdaki denklem ile açıklanmaktadır. Son durumda seçicilik kat sayısı;

$$k = \frac{\Delta R_{kalıp}}{\Delta R_{yarışmacı}} \quad (3.3.)$$

Bağıl seçicilik katsayısı (k') ise aşağıdaki denklem ile hesaplanmaktadır;

$$k' = \frac{k_{MIP}}{k_{NIP}} \quad (3.4.)$$

3.10.1. AFB1 Baskılanmış Nanosensörün Seçiciliği

AFB1 baskılanmış çiplerin seçiciliklerinin belirlenmesi için diğer mikotoksinlerle karşılaştırılmıştır. Okratoksin A (OTA), sitrinin (CIT) ve AFM1 mikotoksinleri AFB1 baskılanmış nanosensörün seçiciliğinin belirlenmesi için seçilmiştir. 0.1 ng.mL⁻¹ derişimde hazırlanan örnekler sisteme verilmiştir ve sonuçlar kaydedilmiştir. Ayrıca AFB1, AFB1, AFG1, AFG2 ve AFM1 tekli, ikili ve dörütlü karışimleri sisteme verilerek AFB1 seçiciliği tartışılmıştır.

3.10.2. AFM1 Baskılanmış Nanosensörün Seçiciliği

AFM1 baskılanmış çiplerin seçiciliklerinin belirlenmesi için diğer mikotoksinlerle karşılaştırılmıştır. Okratoksin A (OTA), sitrinin (CIT) ve AFB1 mikotoksinleri AFM1 baskılanmış nanosensörün seçiciliğinin belirlenmesi için seçilmiştir. 0.1 ng.mL⁻¹ derişimde hazırlanan örnekler sisteme verilmiştir ve sonuçlar kaydedilmiştir. Ayrıca AFB1, AFB1, AFG1, AFG2 ve AFM1 tekli, ikili ve dörütlü karışimleri sisteme verilerek AFB1 seçiciliği tartışılmıştır.

3.11. Tekrar Kullanılabilirlik ve Raf Ömrü

MIP temelli SPR sensörlerin sağladığı en önemli avantajlarından biri tekrar tekrar kullanımının sağlanmasıdır (Esentürk ve ark., 2019). AFM1 ve AFB1 baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla sırasıyla 0.0025 ng.mL⁻¹ ve 0.5 ng.mL⁻¹ derişimde çözeltiler SPR sistemine tekrarlı (5 kez) bir şekilde verilmiş ve sonuçlar incelenmiştir.

Bir diğerk önemli parametre hazırlanan SPR çiplerinin raf ömrünün belirlenmesidir. Farklı zamanlarda aflatoksin tayini gerçekleştirilerek SPR çiplerinin verdiği sinyal yanıtları karşılaştırılmıştır. 1-18 ay aralığında üç aylık periyotlar takip edilerek raf ömrü sonuçları belirtilmiştir.

3.12. Kinetik Modeli

Aflatoksin baskılanmış SPR nanosensörlerinin kinetik ve izoterm analizi, hedef-polimer film etkileşimlerini belirlemek için kullanılmıştır. Toplam bağlayıcı taraf miktarı $[BS]_0$, SPR çip yüzeyinin toplam aflatoksin miktarı gibi maksimum analit bağlama kapasitesi olarak belirtilirse, tüm derişim terimleri bir SPR tepki sinyali olarak ifade edilebilir. Böylece tepki sinyali ΔR , kütlelen molar derişime dönüştürme ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. Serbest analit derişimi akış hücresinde sabit tutulduğu sözde birinci dereceden koşullar altında bağlanma aşağıdaki denklemle açıklanabilir;

$$\frac{d\Delta R}{dt} = k_a C (\Delta R_{max} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (3.5.)$$

burada $d\Delta R/dt$, SPR yanıt sinyalinin değışim hızıdır; ΔR ve ΔR_{max} , analit bağlandıktan sonra ölçülen ve maksimum tepki sinyalini ifade etmektedir; C , hedef analit derişimi ($ng \cdot mL^{-1}$), k_a ve k_d değerleri sırasıyla bağlanma hız sabiti ($(ng \cdot mL^{-1})^{-1} \cdot s^{-1}$) ve ayrılma hızı (s^{-1}) sabitlerini temsil etmektedir. Bağlanma sabiti K_A , hız sabitleri k_a ve k_d kullanılarak $K_A = k_a/k_d$ ($ng \cdot mL^{-1}$) eşitliğinden hesaplanabilir. Dengede, $d\Delta R/dt = 0$ olur ve denklem şu şekilde yeniden yazılabilir:

$$\frac{\Delta R_{eq}}{C} = K_A \Delta R_{max} - K_A - \Delta R_{eq} \quad (3.6.)$$

Bu nedenle, $\Delta R_{eq}/C$ 'ye karşı ΔR_{eq} çizimi, bağlanma sabiti K_A 'yı ve ayrılma sabiti K_D 'nin $1/K_A$ 'ya karşılık gelir ve hesaplanmasını sağlar. Eşitlik (3.6), aşağıdaki şekilde yeniden düzenlenebilir:

$$\frac{d\Delta R}{dt} = k_a C \Delta R_{max} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (3.7.)$$

Bu nedenle, dR/dt 'nin R 'ye karşı çizilmesi, etkileşim kontrollü kinetikler için eğimli düz bir çizgi olacaktır $-(k_a C + k_d)$. Derişim sinyalleri, analit derişimi ile doğru orantılı olan ilk bağlanma oranı ($\Delta R = 0$ 'da) arasındaki ilişki kullanılarak elde edilebilir. Yüzeyi tamamen doyurmak için yüksek bir analit derişimi gerektiğinden ΔR_{max} değerini deneysel olarak belirlemek zor olsa da, ΔR_{max} biliniyorsa, hem k_a hem de k_d tek bir birleşim sensorgramından hesaplanabilir. Bağlanma sensorgramının birkaç farklı analit derişiminde düşünülmesi tercih edilen bir yaklaşımdır. S değeri ile ilgili ileri ve geri oranları, toplam dedektör yanıtındaki ($d\Delta R/dt$) ve ΔR 'ye göre değişiklik aşağıdaki gibi çizilerek eğim olarak hesaplanabilir:

$$S = k_a C + k_d \quad (3.8.)$$

C 'ye karşı S 'nin bir grafiğı, eğimi k_a olan düz bir çizgi olacaktır ve koordinattaki kesişme ($C=0$) k_d 'ye karşılık gelmektedir: ancak pratikte bu, $k_a C > k_d$ ise ayrılma hızı sabitinin güvenilir bir ölçüsü olarak kullanılamaz. Bu değer, doymuş bağlanma bölgelerinden ayrışmanın, analit içermeyen bir tampon çözelti akışının doğrudan ölçülmesiyle daha doğru bir şekilde elde edilebilir. Ayrışma şu şekilde ölçülür:

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (3.9.)$$

burada ΔR_0 , t_0 'daki başlangıç yanıt seviyesidir ve t zamanlarda ΔR , ayrılma eğrisi boyunca elde edilen değerleri temsil etmektedir (Yılmaz ve ark., 2017).

Bağlanma kinetiğı analizi, yalancı-birinci dereceden adsorpsiyon kinetiğine dayanan bir yaklaşımdır (Krishnamoorthy ve ark., 2010);

$$\frac{\Delta R_{ex}}{C} = K_a \Delta R_{max} - K_A \Delta R_{eq} \quad (3.10.)$$

Bağlanma bölgelerinin sayısının hesaplanması ve serbest geri bağlanmalı hedef/polimer yüzey bağlanma etkileşimleri için verilerin analizi genellikle Scatchard tarafından hesaplanmaktadır. Kinetik hız sabitlerinin bağlanma kinetik analizi yaklaşımı ve denge analizi yaklaşımı (Scatchard) ile hesaplanmıştır.

3.13. Adsorpsiyon Modeli

Çözünen maddenin çözüldüğü bir adsorban üzerine dinamik adsorptif ayrılmasının başarılı bir şekilde temsil edilmesi, iki faz arasındaki denge ayrımının uygun bir açıklamasına bağlıdır. Adsorpsiyon dengesi, adsorban üzerine adsorbe edilen çözünen madde miktarı, desorbe edilen miktara eşit olduğunda ve denge çözeltisi derişimi bu noktada sabit kaldığında oluşturulur. Sıvı faz derişimine karşı katı faz derişimi çizilerek denge adsorpsiyon izotermi tanımlamak mümkündür.

Adsorpsiyonun denge özelliklerini tanımlamak için çeşitli izoterm denklemleri kullanılmaktadır. Hem adsorpsiyon mekanizması hem de adsorbent yüzey özellikleri ve afinitesi, denklem parametrelerinden ve bu izoterm modellerinin temelinde yatan termodinamik varsayımlardan anlaşılabilir (Kundu ve Gupta, 2006).

Adsorpsiyon modelleri, moleküler baskılama temelli nanosensörlerin tanıma kabiliyetini, etkileşim seçiciliğini ve yüzey homojenliğini tanımlamak için de kullanılmaktadır. Langmuir, Freundlich, ve Langmuir-Freundlich izoterm modelleri deneysel verileri açıklamak için hesaplanmıştır. Homojen bir bağlanma bölge modeli olan Langmuir izoterm modeli, MIP temelli etkileşim modeline uyduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, çalışmalar giderek artan bir şekilde MIP'lerin heterojen bağlanma bölgelerine sahip olduğunu da göstermektedir. Freundlich modeli heterojen bir modeldir. Düşük konsantrasyon bölgesindeki MIP adsorpsiyon izoterm verilerine mükemmel uyum göstermektedir (pg.mL^{-1} - ng.mL^{-1}) ancak doyma davranışına uygun model değildir ve yüksek derişimli bölgelerde deneysel izotermelerden sapmaktadır. Freundlich modeli, analit moleküllerinin çok katmanlı bağlanmasını göstermek için kullanılmaktadır. Langmuir-Freundlich, geniş derişim bölgelerinde adsorpsiyon davranışı hakkında heterojenlik bilgisi sağlayan bir sisteme uygulanabilir. Uygulanan modeller arasında yüksek regresyon (bağlanım) katsayısına sahip ve

deneysel verilerle uyumlu olan sonuçlara sahip izoterm modeli belirlenmektedir (Yılmaz ve ark., 2017).

3.13.1. Langmuir İzoterm Modeli

Langmuir izotermi, adsorpsiyon ve desorpsiyon (dinamik denge) oranlarını dengeleyerek yüzey içeriğini açıklar. Adsorpsiyon, adsorban yüzeyinin açık olan fraksiyonu ile orantılıyken, desorpsiyon, kaplanan adsorban yüzeyinin fraksiyonu ile orantılıdır (Ayawei, Ebelegi, & Wankasi, 2017). Langmuir izoterm teorisi, adsorpsiyonun adsorban içindeki belirli homojen bölgelerde gerçekleştiğini varsayar, yani bir sorbat molekülü bir bölgeyi işgal ettiğinde, o bölgede başka adsorpsiyon gerçekleşemez (Kundu ve Gupta, 2006):

Langmuir denklemi aşağıdaki doğrusal formda yazılabilir:

$$q_e = \frac{bQ_0C_e}{1+bC_e} \quad (3.11.)$$

Burada C_e denge analit (adsorbat) derişimini ifade etmektedir (mg.L^{-1}); q_e analitin miktarı mg.g^{-1} ; Q_0 teorik tek tabakalı kapasite mg.g^{-1} ; b adsorpsiyon enerjisi ile ilgili adsorpsiyon denge sabitidir.

3.13.2. Freundlich İzoterm Modeli

Freundlich izoterm adsorpsiyon denklemini tanımlayan bilinen en eski bağlantıdır. Freundlich izotermi heterojen yüzeylerde meydana gelen adsorpsiyon süreçlerine uygulanabilir. Bu izoterm, aktif alanların ve enerjilerinin yüzey heterojenliğini ve üstel dağılımını tanımlayan bir ifade verir. Çözeltideki analit derişmi arttıkça adsorban yüzeyindeki analit derişiminin de arttığını ve bu nedenle üstel bir ifadeye sahip olduğunu varsayar:

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (3.12.)$$

bu denklemde K_F ve n sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon yoğunluğunu ifade eden Freundlich sabitleridir.

Adsorpsiyon işlemlerinden elde edilen doğruluk seviyesi büyük ölçüde adsorpsiyon izotermelerinin başarılı modellenmesine ve yorumlanmasına bağlıdır. Bu nedenle, çeşitli adsorpsiyon sistemlerinde farklı modellerin belirlenmesi ve açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

3.14. Gıda Örneklerinde Aflatoksin Tayininin HPLC ile Karşılaştırılması

Aflatoksinlerin seçici ve hassas tayini için tasarlanan çipler ile geniş bir derişim aralığında algılama ve düşük tayin sınırları elde edilmiştir. AFB1 ve AFM1 ile kirletilmiş gıda örnekleri aynı zamanda geleneksel bir tayin yöntemi olan Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific) sistemi ile ölçülmüştür. 1.0 ng.mL^{-1} , 5.0 ng.mL^{-1} ve 10 ng.mL^{-1} arasında değişen örnekler hazırlanmıştır. Sonuçlar SPR sensör sistemi ile karşılaştırılmış ve % geri kazanım hesaplamaları yapılmıştır.

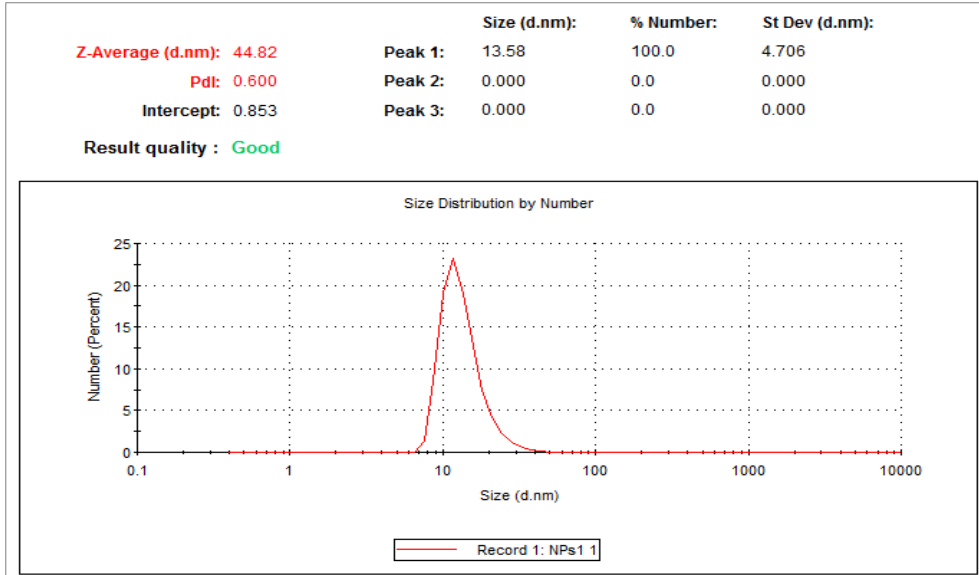
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması altı ana başlıkta özetlenmiştir; i) altın nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu; ii) SPR sensör çiplerin allil modifikasyonu ve karakterizasyonu; iii) biyomimetik sensör çip yüzeylerinin tasarımına yönelik baskılanmış polimerik filmlerin hazırlanması; iv) AFM1 ve AFB1 baskılanmış polimer film temelli çiplerin hazırlanması ve karakterizasyonu; v) ikincil metabolitler AFM1 ve AFB1 tayininde optik temelli SPR sensör sisteminin kullanımının incelenmesi; vi) gıda örneklerinde aflatoksin belirlenmesi; ve vii) MIP temelli çiplerin tekrar kullanılabilirlik ve raf ömrü performansına ait sonuçlar incelenmiştir.

4.1. Sentezlenen Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyon Verileri

4.1.1. Altın Nanopartiküllerin Zeta-Boyut Analizi

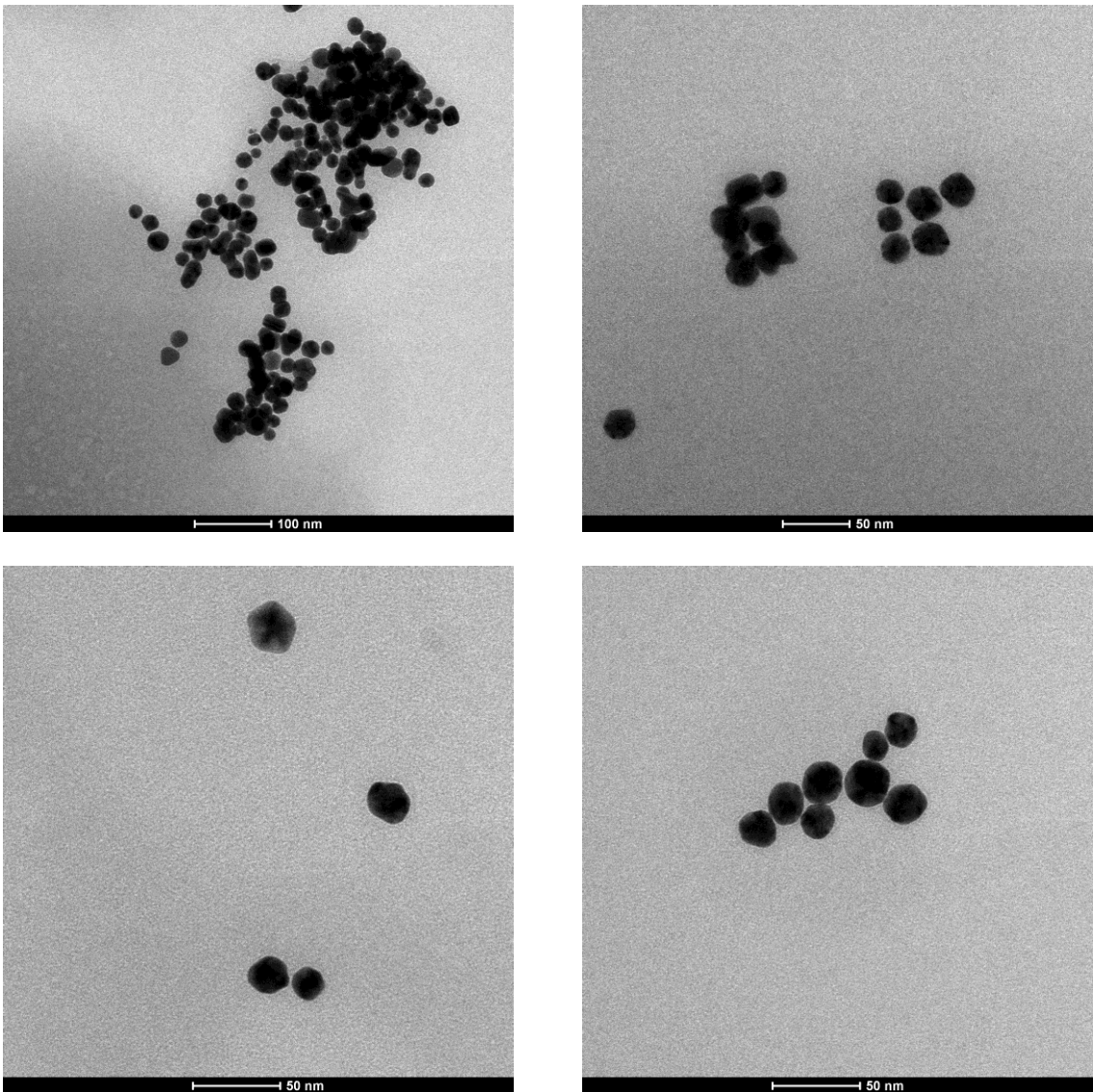
Turkhevic metodu ile sentezlenen altın nanopartiküllerin (AuNPs) boyut analizi Zetasizer cihazı ile yapılmıştır. AuNP'lerin parçacık boyutu, zeta boyut analizi sonucu 13.58 ± 1.7 nm olarak ölçülmüştür. Şekil 4.1'de zeta boyut analizi sonuçları ve AuNP'lerin PDI değerleri verilmektedir.



Şekil 4.1. AuNP'lerin zeta boyut analizi sonuçları.

4.1.2. Altın Nanopartiküllerin TEM Analizi

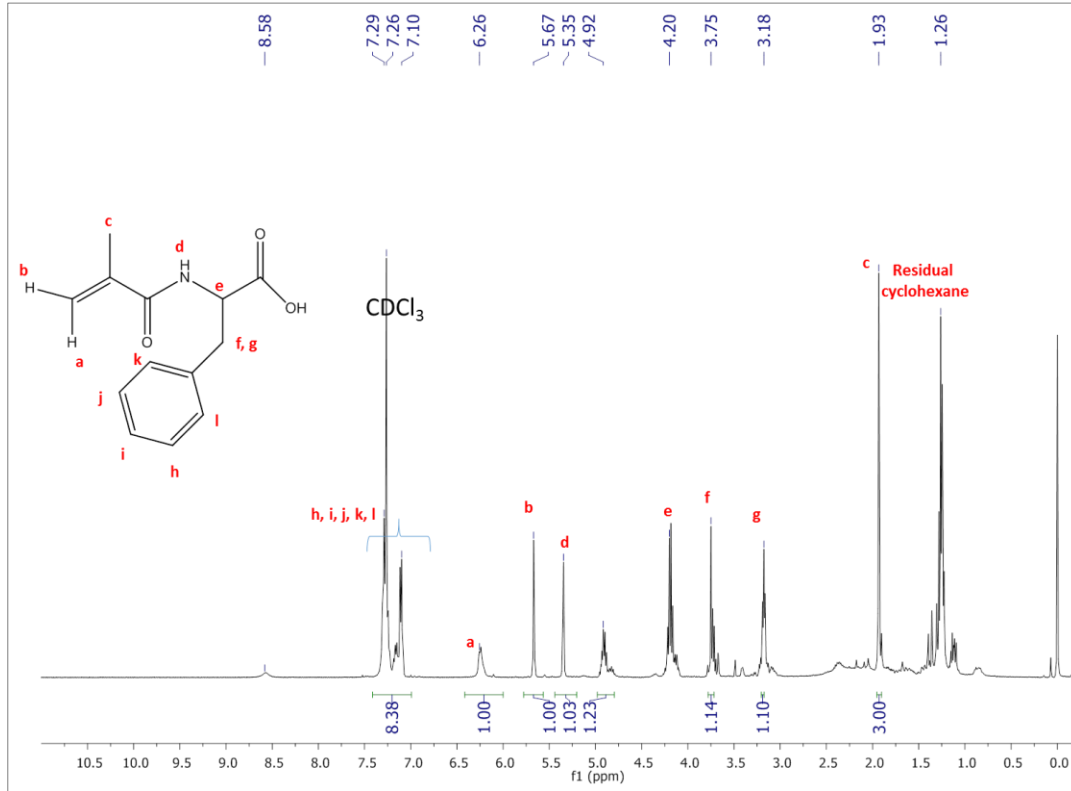
AuNP'lerin yüzey morfolojisi geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (Zeiss Evo 40, Almanya) ile incelenmiştir. TEM görüntüleri sonuçlarına göre AuNP'ler tek tek ve kümeleşen gruplar halinde görülmektedir. Ayrıca boyutları ve morfolojileri homojen olduğu söylenebilir. AuNP'lerin ortalama boyutları 12.5 nm ve 16.66 nm olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar zeta boyut analizi ile karşılaştırıldığında nanopartiküllerin başarılı bir şekilde sentezlendiği gösterilmiştir. Şekil 4.2'de AuNP'lerin TEM görüntüleri verilmektedir.



Şekil 4.2. AuNP'lerin TEM karakterizasyon görüntüleri.

4.2. N-metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) Monomerinin Karakterizasyonu

¹H NMR spektrumu, CDCl₃ içerisinde 400 MHz Bruker FT-NMR kullanılarak kaydedilmiştir. Bu karakteristik pikler aşağıdaki gibidir; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.10-7.29 (m, 5H + CHCl₃), 6.26 (s, 1H), 5.67 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), , 3.75 (d, 1H), 3.18 (d, 1H), 1.93 (s, 1H).

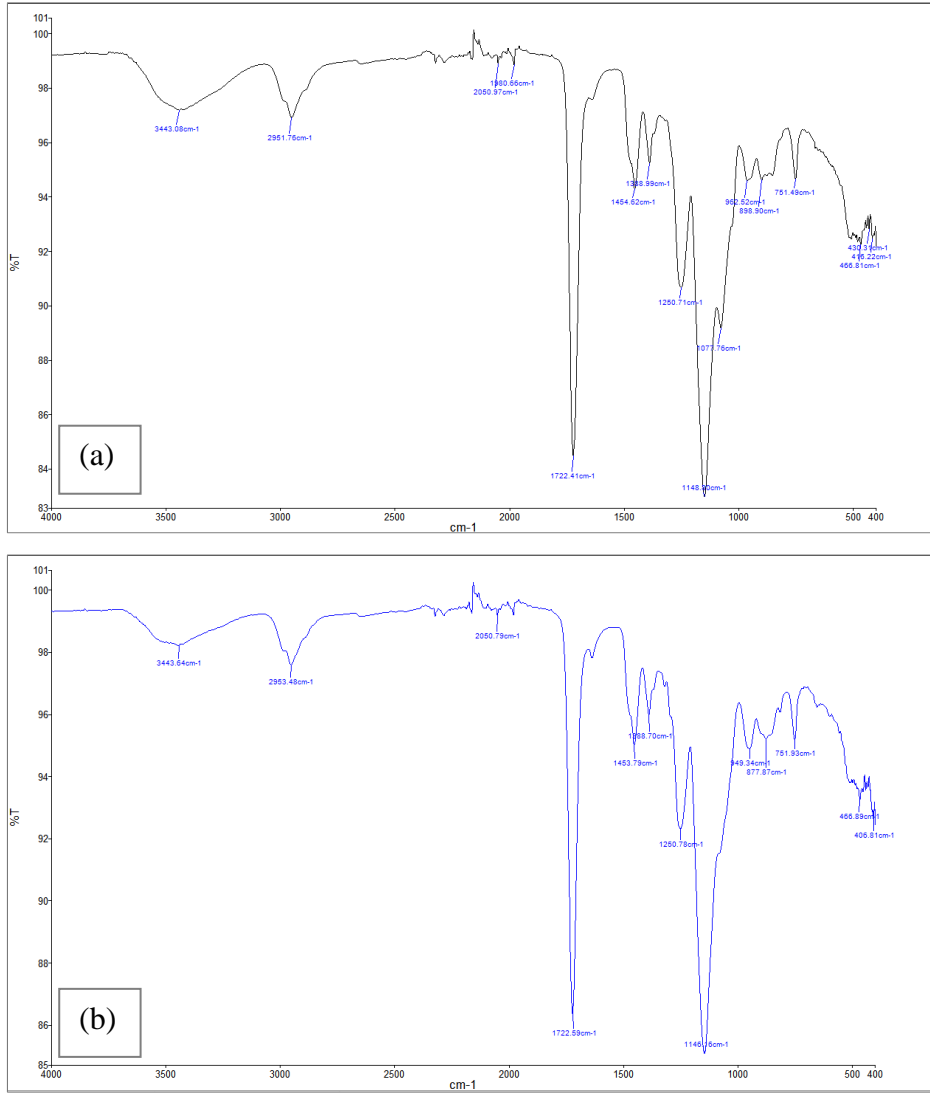


Şekil 4.3. MAPA monomerinin ¹H NMR spektrumu.

4.3. Aflatoksin Baskılanmış SPR Sensör Çiplerin Karakterizasyon Sonuçları

4.3.1. FTIR-ATR Analizi

AFB1 ve AFM1 baskılanmış çiplerin FTIR-ATR sonuçları Şekil 4.4'de gösterilmektedir. HEMA monomerinin yapısında bulunan; -OH ve -C=O gruplarının gerilme bantları sırasıyla 3440 cm⁻¹ ve 1722 cm⁻¹ civarlarında görülmektedir. MAPA monomerinin yapısında bulunan aromatik halkadan kaynaklı 1454 cm⁻¹ civarındaki C=C gerilmeleri bantları ve 1148-1176 cm⁻¹ civarında aromatik C-H halka bükülmesi piklerini göstermektedir.

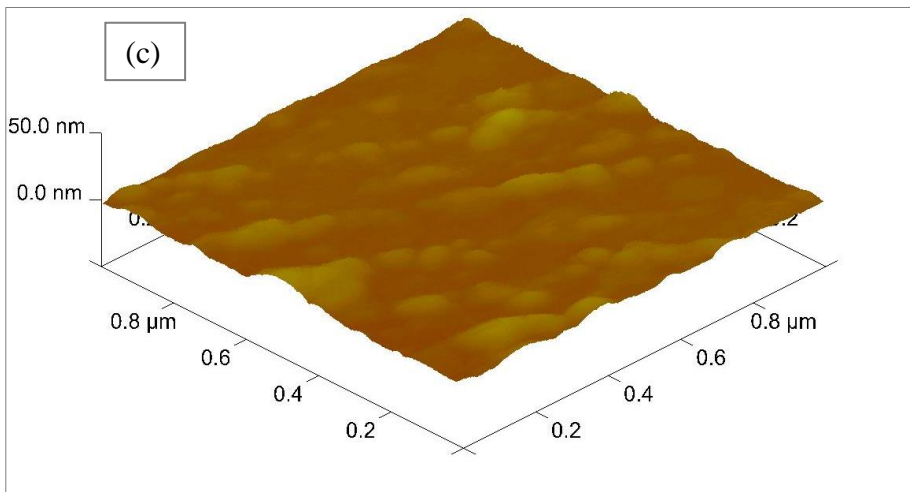
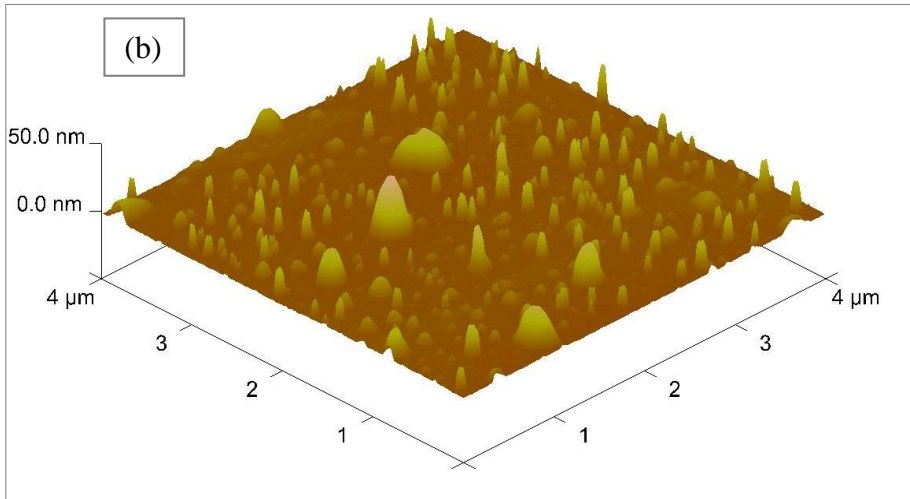
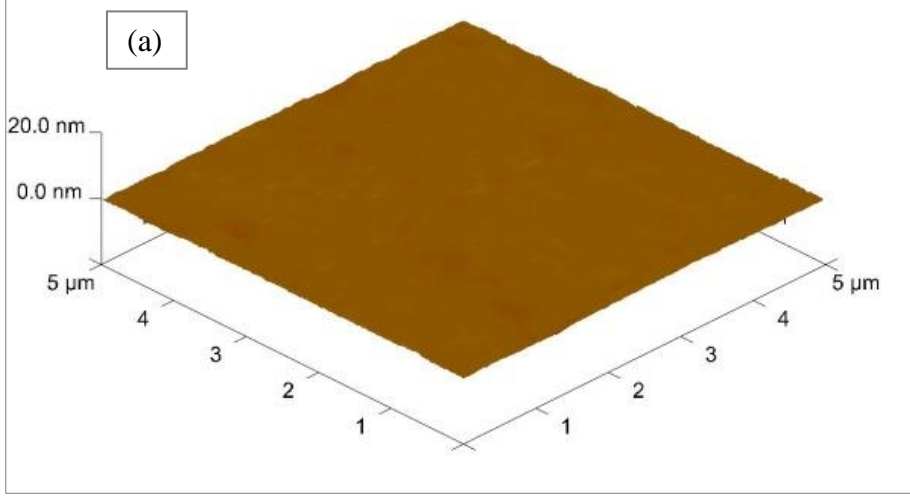


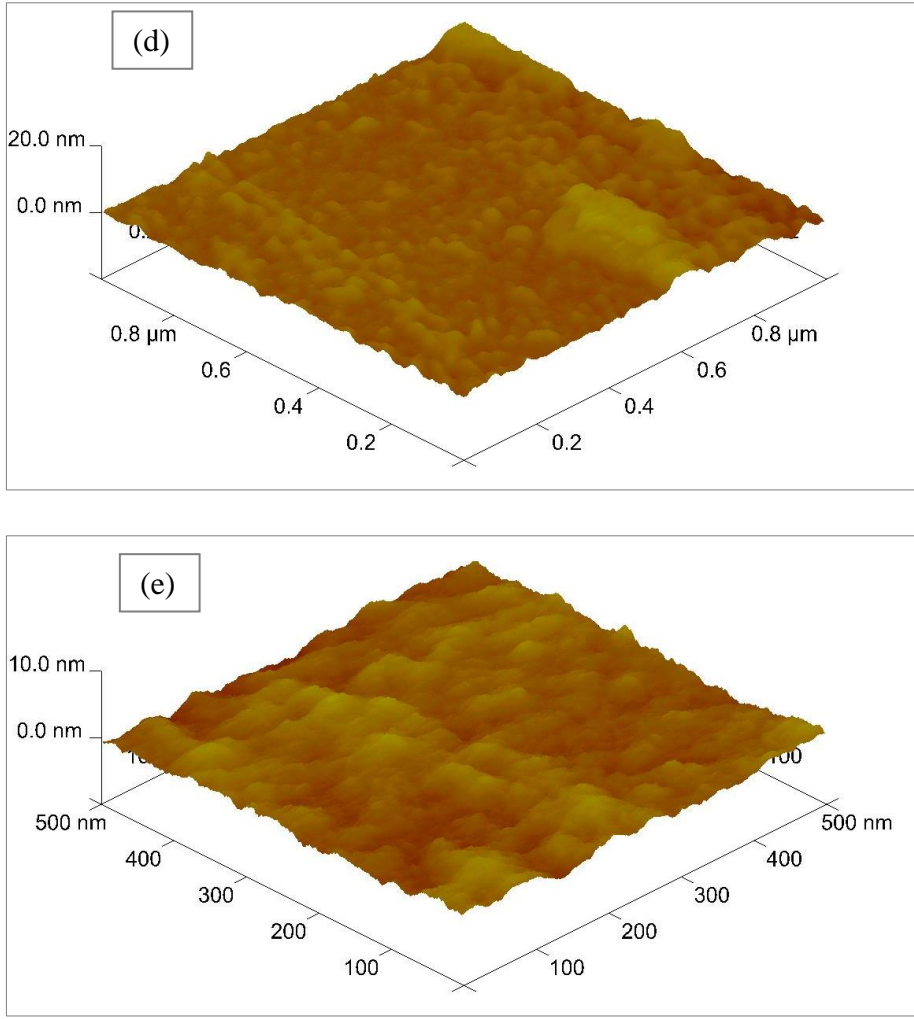
Şekil 4.4. (a) AFB1 baskılanmış; (b) AFM1 baskılanmış SPR çiplerine ait FTIR-ATR spektrum sonuçları.

4.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Modifiye edilmemiş, allil modifikasyonu, AFB1 baskılanmış, AFM1 baskılanmış çip yüzeyi ve baskılanmamış çip yüzey morfolojisi non-contact modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Boş SPR çipin yüzey derinliği 0.80 nm olarak tespit edilmiştir. Allil modifikasyonu, AFM1 baskılanmış, AFB1 baskılanmış ve baskılanmamış çiplerin ortalama pürüzlülüğü 1.87, 8.08, 9.4 ve 4.84 nm olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar aflatoxin baskılanmış ve baskılanmamış nanofilmlerin SPR çip altın yüzeyine homojen bir şekilde kaplandığını göstermektedir. Şekil 4.5 boş çip; allil

modifikasyon; NIP; AFM1 baskılanmış; AFB1 baskılanmış SPR çiplerin AFM görüntüsü verilmiştir



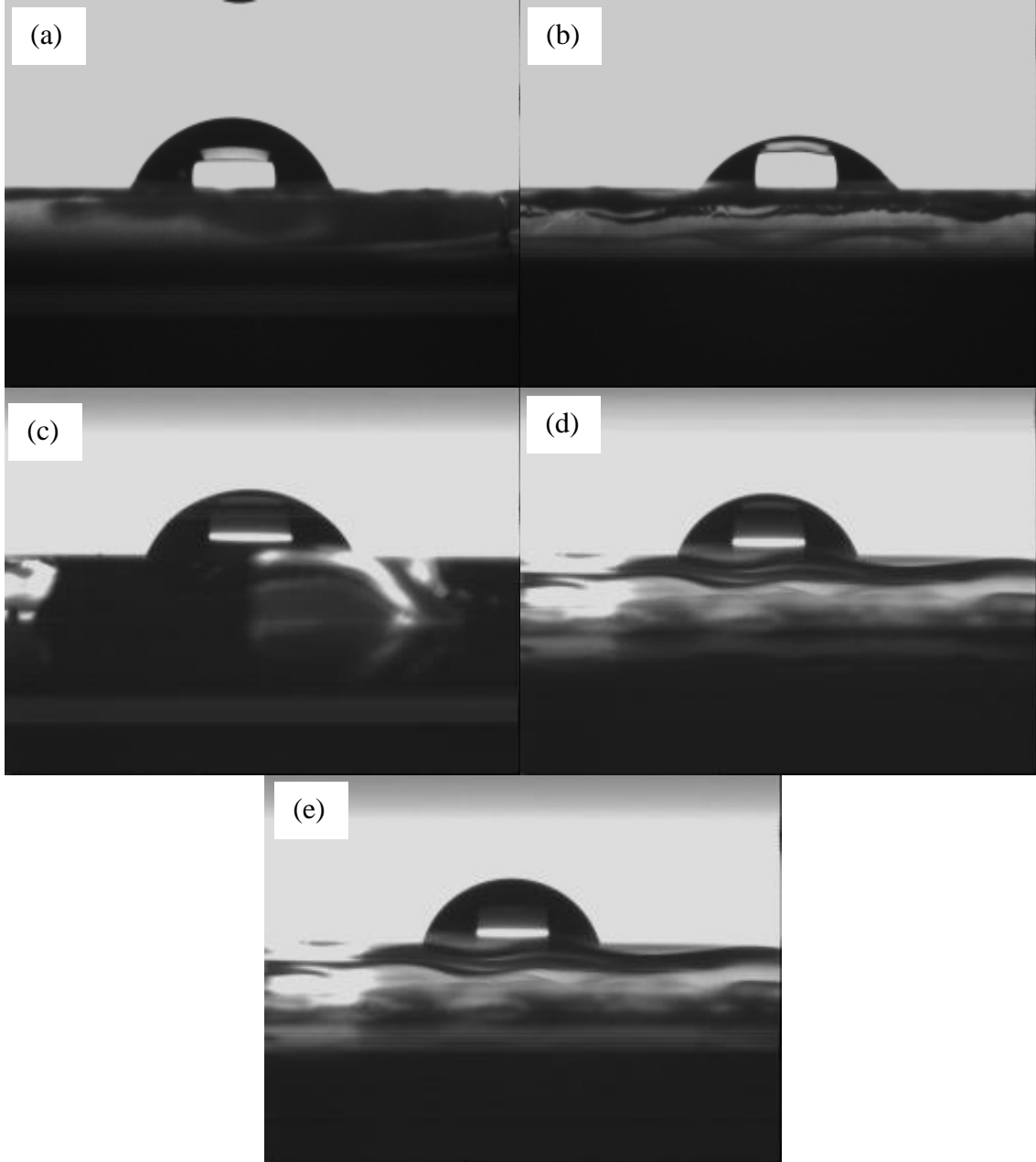


Şekil 4.5. SPR çiplerin AFM görüntüsü: (a) boş çip; (b) allil modifikasyonu; (c) NIP; (d) AFM1 baskılanmış; (e) AFB1 baskılanmış çip.

4.3.3. Temas Açısı Analizi

Modifiye edilmiş SPR sensör çiplerin yüzeyine bir damla su damlatılarak Sessile Drop yöntemiyle temas açısı belirlenmiştir. Çip altın yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatarak üç farklı fotoğraf çekilmiştir ve her biri için temas açısı belirlenmiştir. Modifiye edilmemiş ve polimer film kaplı çip yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan üç ölçümün ortalama değerleri olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1’de tasarlanan çiplerin temas açısı değerleri verilmektedir. Bu sonuçlara göre boş altın yüzey, allil modifikasyonu yapılan çip yüzeyi ile karşılaştırıldığında yüzeye hidrofilik grupların bağlandığı açının 69.5° ’den 58.1° ’ye azalmasıyla görülmektedir. Boş altın yüzey, allil modifikasyonu, AFB1 baskılanmış, AFM1 baskılanmış, ve baskılanmamış çip

yüzeylerin temas açısı ölçümleri sırasıyla 69.5° , 58.1° , 72.8° , $71,3^\circ$ ve $74,9^\circ$ olarak bulunmuştur. Yüzey modifikasyonu sonrası AFB1 baskılanmış ve AFM1 baskılanmış çiplerde temas açısı değerlerinin arttığı sonucuna varılmıştır. Bunun nedeni yüzeyde polimer filmin sahip olduğu hidrofobik grupların bulunduğu MAPA fonksiyonel monomeridir. Şekil 4.6’da temas açısı alınan çiplerin görüntüleri verilmiştir.



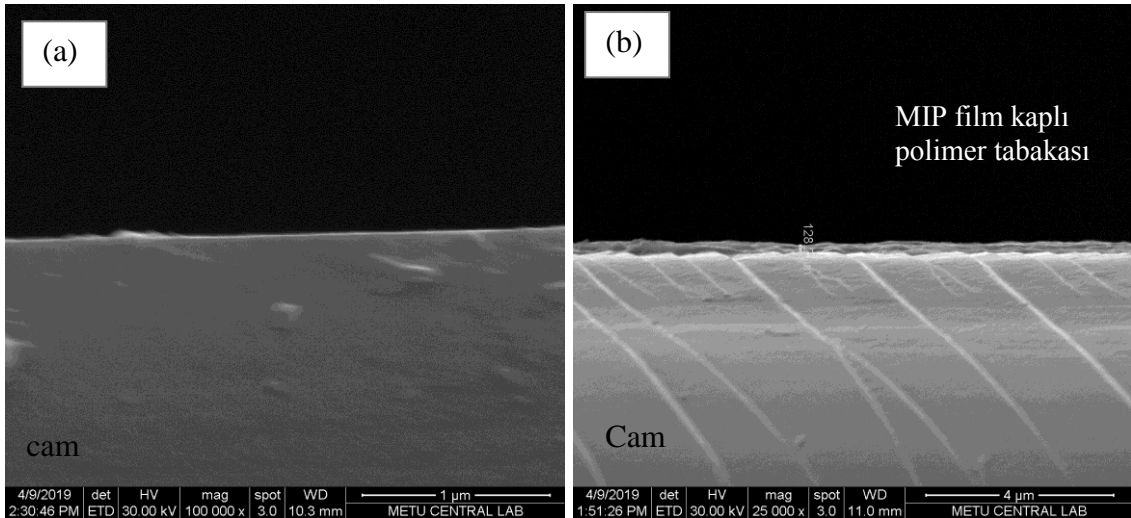
Şekil 4.6. SPR nanosensör çip temas açısı görüntüleri: (a) modifiye edilmemiş; (b) allil modifikasyonu; (c) NIP; (d) AFM1 baskılanmış; (e) AFB1 baskılanmış.

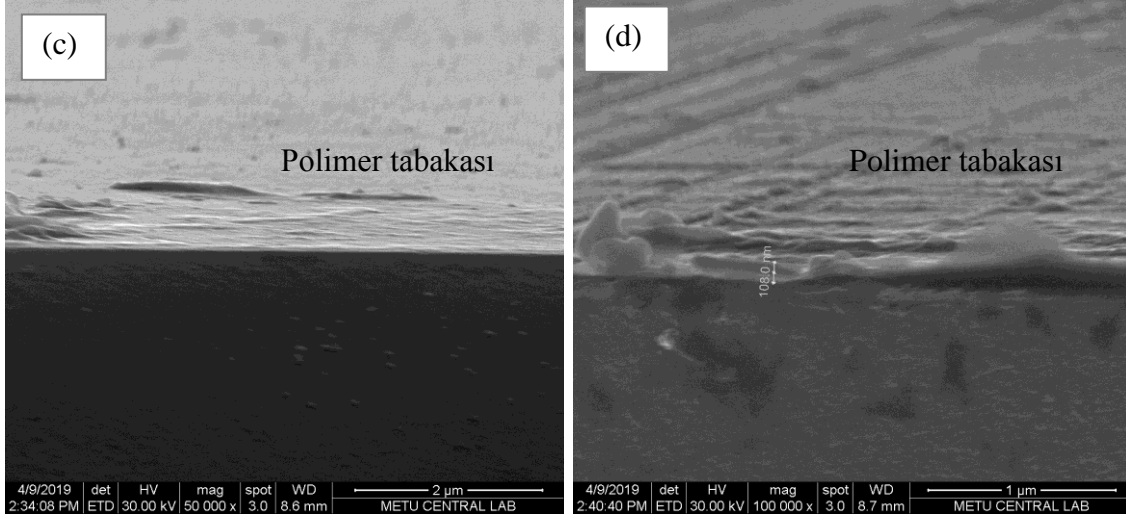
Çizelge 4.1. SPR çiplerin temas açısı sonuçları.

Çip yüzeyi	Temas Açısı, °
Altın boş yüzey	69.5
Allil modifikasyonu	58.1
AFM1 baskılanmış	71.3
AFB1 baskılanmış	72.8
NIP	74.9

4.3.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi

Baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzey morfolojileri ve yapısı taramalı elektron mikroskopu kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.7’de tasarlanan çip yüzeylerinin morfolojisi ve yan-kesit görüntüleri verilmiştir. Modifiye edilmemiş çip SEM görüntüsü Şekil 4.7(a)’da verilmiştir. SEM analizine göre, altın yüzeyin AFB1 baskılanmış polimer film kaplanması yaklaşık 128 nm kalınlığında olduğu Şekil 4.7(b)’de görülmektedir. Şekil 4.7(c), altın yüzeyin üzerinde hareketsiz bulunan polimer film üstten görünüşünü göstermektedir. SEM analizine göre, altın yüzeyin AFM1 baskılanmış polimer film kaplanması yaklaşık 108 nm kalınlığında olduğu Şekil 4.7(d)’de görülmektedir. Bu sonuçlara göre polimer film kalınlığının ~128-108 nm olduğu ve polimer filmin çip altın yüzeylerine homojen bir şekilde kaplanması başarıyla gerçekleştirilmiştir.

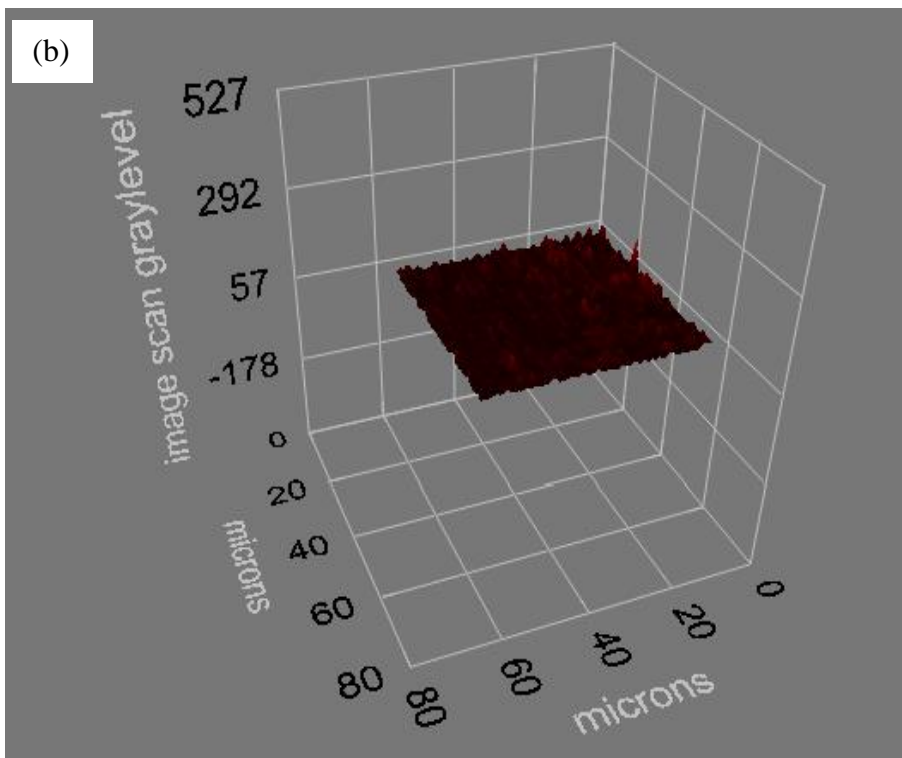
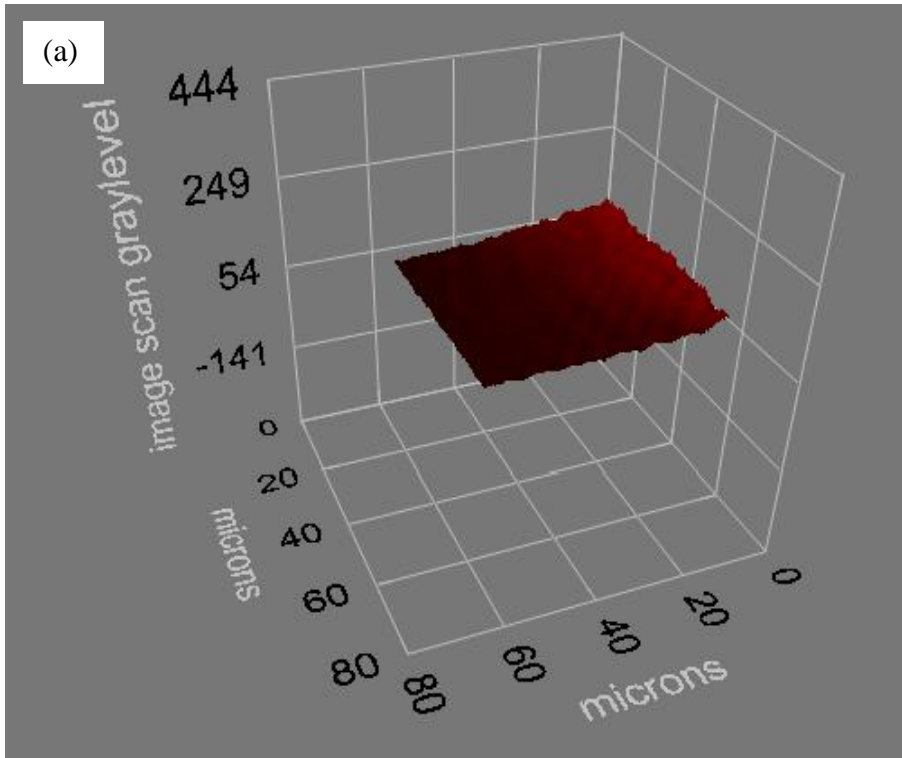


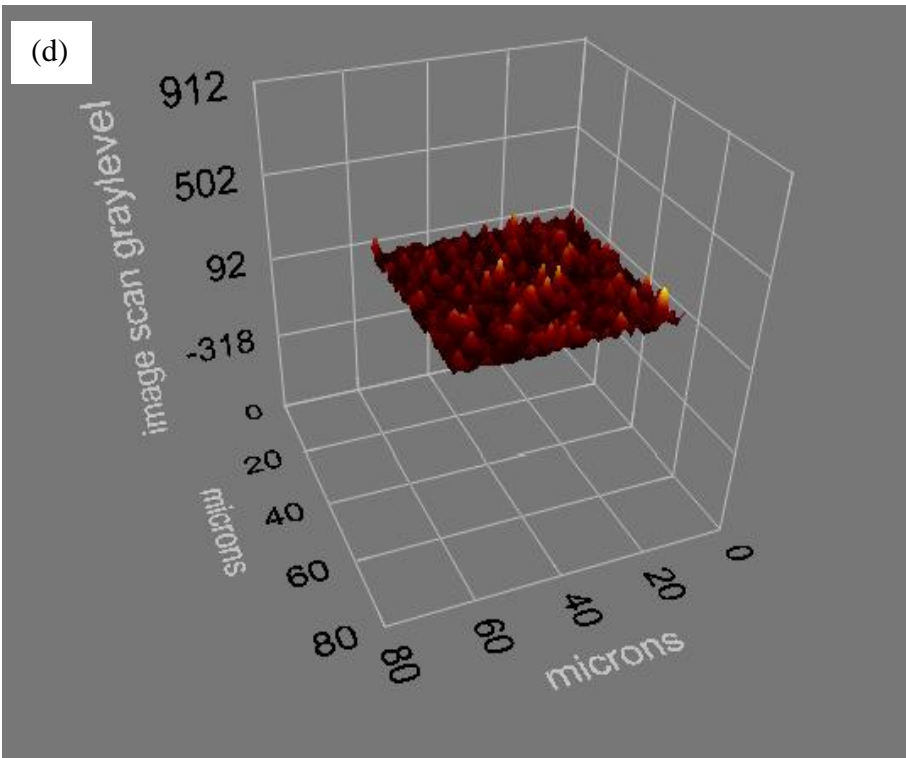
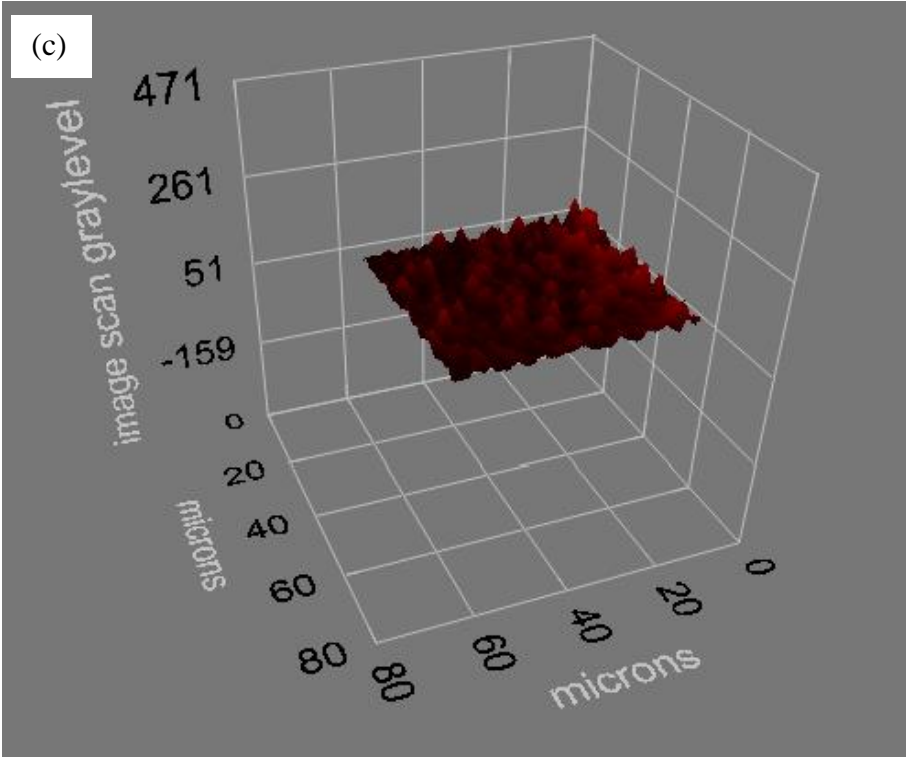


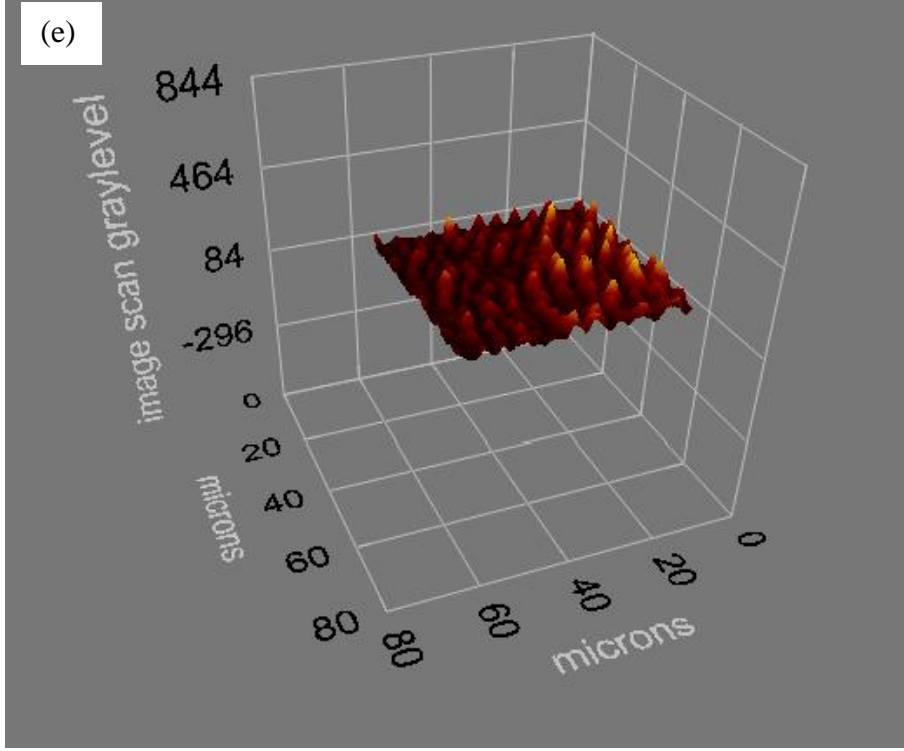
Şekil 4.7. SEM cihazı kullanılarak altın yüzey üzerindeki immobilizasyon işleminin Karakterizasyonu; (a) modifiye edilmemiş çip enine kesit görüntüsü; (b) AFB1 baskılanmış çip enine kesit (c) AFB1 baskılanmış çip yüzeyin görüntüsü; (d) AFM1 baskılanmış enine kesit ve çip yüzeyin görüntüsü.

4.3.5. Elipsometre Analizi

Hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış SPR çiplerin ortalama yüzey kalınlık ölçümleri Nanofilm-EP3Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Modifiye edilmemiş çip, allil modifikasyonu, baskılanmamış, AFM1 baskılanmış ve AFB1 baskılanmış SPR biosensör çiplerden alınan elipsometre görüntüleri Şekil 4.8'de verilmektedir. Boş SPR çipin yüzey kalınlığı 50 nm olarak tespit edilmiştir. Boş çipin yüzey kalınlığı çıkarıldığında allil modifikasyonu, AFM1 baskılanmış, AFB1 baskılanmış ve baskılanmamış çiplerin yüzey polimer kalınlıkları 25 nm, 88 nm, 82 nm and 75 nm olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçların değişimi aflatoxin baskılanmış ve baskılanmamış nanofilmlerin SPR çip altın yüzeyine uygun bir şekilde kaplandığını göstermektedir. Yüzey kalınlıkları optik dönüştürücü prensibi ile çalışan SPR sensör sistemi ile tayin alanı bölgesiyle uyumlu olduğu varsayılmıştır.





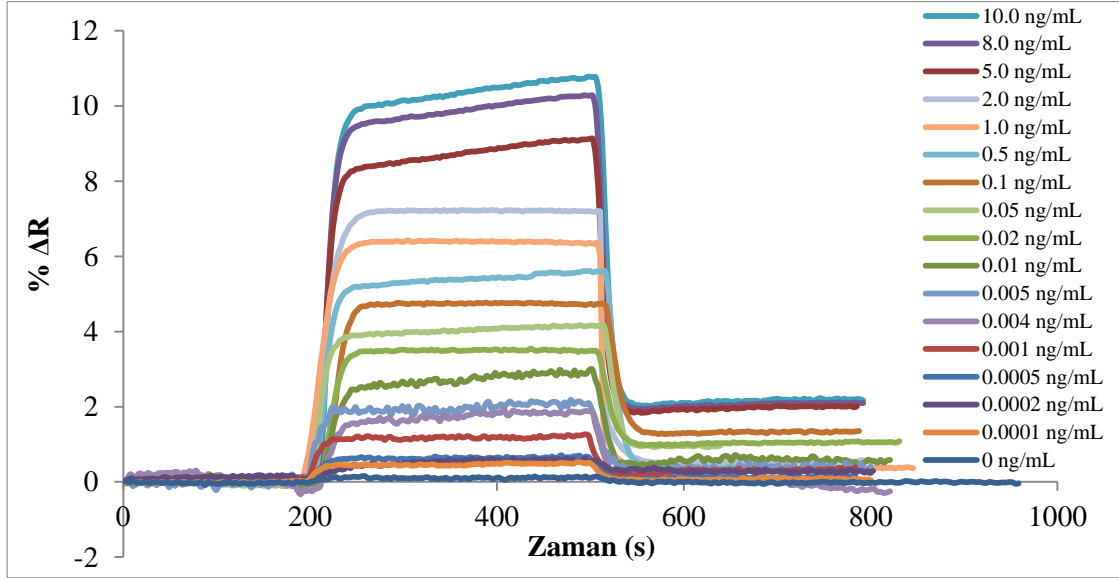


Şekil 4.8. SPR nanosensor çip elipsometre görüntüleri: (a) modifiye edilmemiş çip; (b) allil modifikasyonu; (c) baskılanmamış; (d) AFM1 baskılanmış; (e) AFB1 baskılanmış çip.

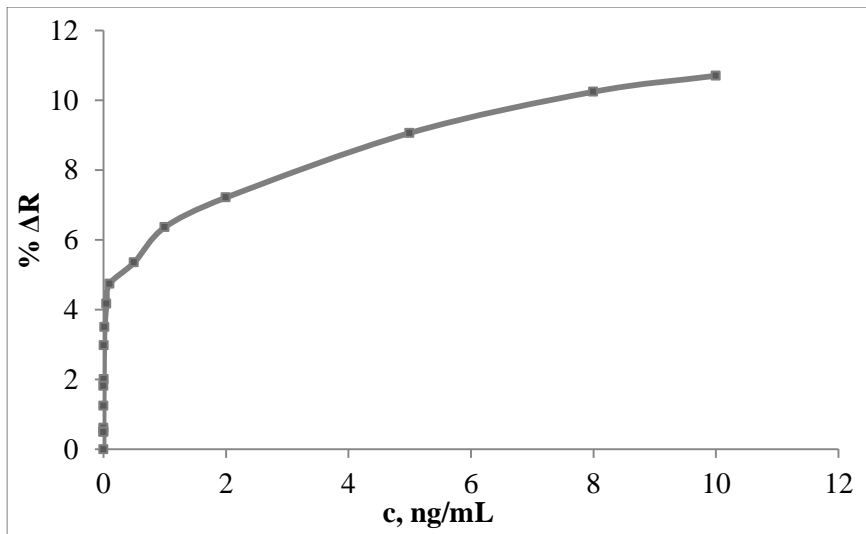
4.4. Aflatoksin Tayini

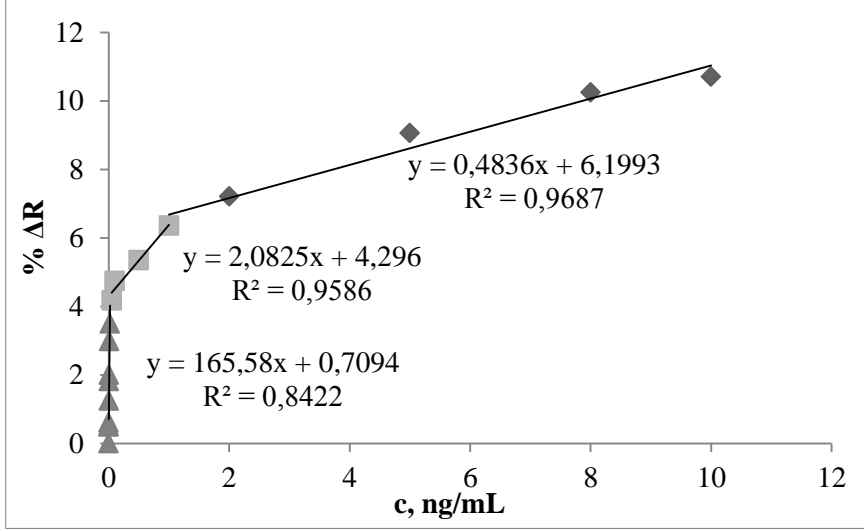
Hazırlanan aflatoksin baskılanmış çip SPR sensör cihazı çip hücrelerine yerleştirdikten sonra çip yüzeyinin dengeye gelmesi için adsorpsiyon tamponu sistemden geçirilmiştir. Daha sonra plazmon ayarı yapıldı ve çip yüzeyinden seçilen bölgelerle geniş derişim aralığında hazırlanan AFB1 çözeltileri sisteme verilmiştir. Sistemden sırasıyla 3 dak adsorpsiyon tamponu 5 dak Aflatoksin B1 çözeltisi ve 3 dak desorpsiyon çözeltisi geçirilmiştir. Eş zamanlı olarak aflatoksin tayini izlenmiştir ve sensör yanıtları kaydedilmiştir. AFB1 tayini için geniş derişim aralığında eş zamanlı sensör yanıtları Şekil 4.9’da görülmektedir. Artan AFB1 derişimi ile ΔR_{maks} değerleri artmaktadır. AFB1 derişimi arttıkça aktif seçici bağlanma bölgelerine bağlanan analit derişimi ΔR_{maks} değerini artırmaktadır. Bağlanma bölgeleri doygunluğa ulaştığında ise ΔR_{maks} değerinde çok büyük bir değişiklik meydana gelmemektedir. 0 ng.mL^{-1} ve 0.02 ng.mL^{-1} derişim aralığında sinyal ΔR değerleri doğru denklemi $y=165.58x+0.7004$, $0.05-1.0 \text{ ng.mL}^{-1}$ aralığında doğru denklemi $y=2.0825x+4.296$ ve $2.0-10.0 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim

aralığında doğru denklemi ise $y=0.4836x+6.1993$ olarak hesaplanmıştır. $0-0.02 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim aralığında %84 doğrulukta, $0.05 \text{ ng.mL}^{-1}-1.0 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim aralığında %95 doğrulukta ve $2.0 \text{ ng.mL}^{-1}-10.0 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim aralığında yaklaşık %97 doğrulukta AFB1 tayinini yapılmaktadır. AFB1 derişimine bağı kalibrasyon grafiğı Şekil 4.10'da gösterilmektedir. Tayin sınırını (LOD) değerleri $\text{LOD}=3S/b$ olarak ifade edilebilir, burada S, yanıtın standart sapmasıdır (Akgönüllü ve ark., 2019). AFB1 baskılanmış nanosensörün LOD değeri 1.04 pg.mL^{-1} olarak hesaplanmıştır.

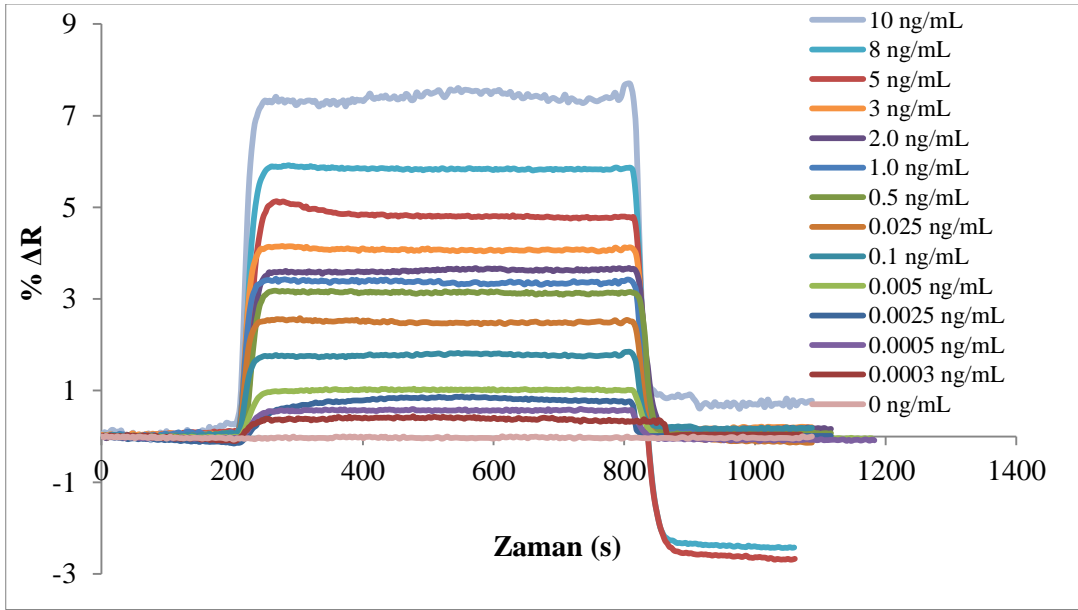


Şekil 4.9. AFB1 baskılanmış SPR nanosensör ile AFB1 çözeltileri arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar; $0 \text{ ng.mL}^{-1}-10 \text{ ng.mL}^{-1}$ geniş derişim aralığında alınan sinyallerin karşılaştırılması.





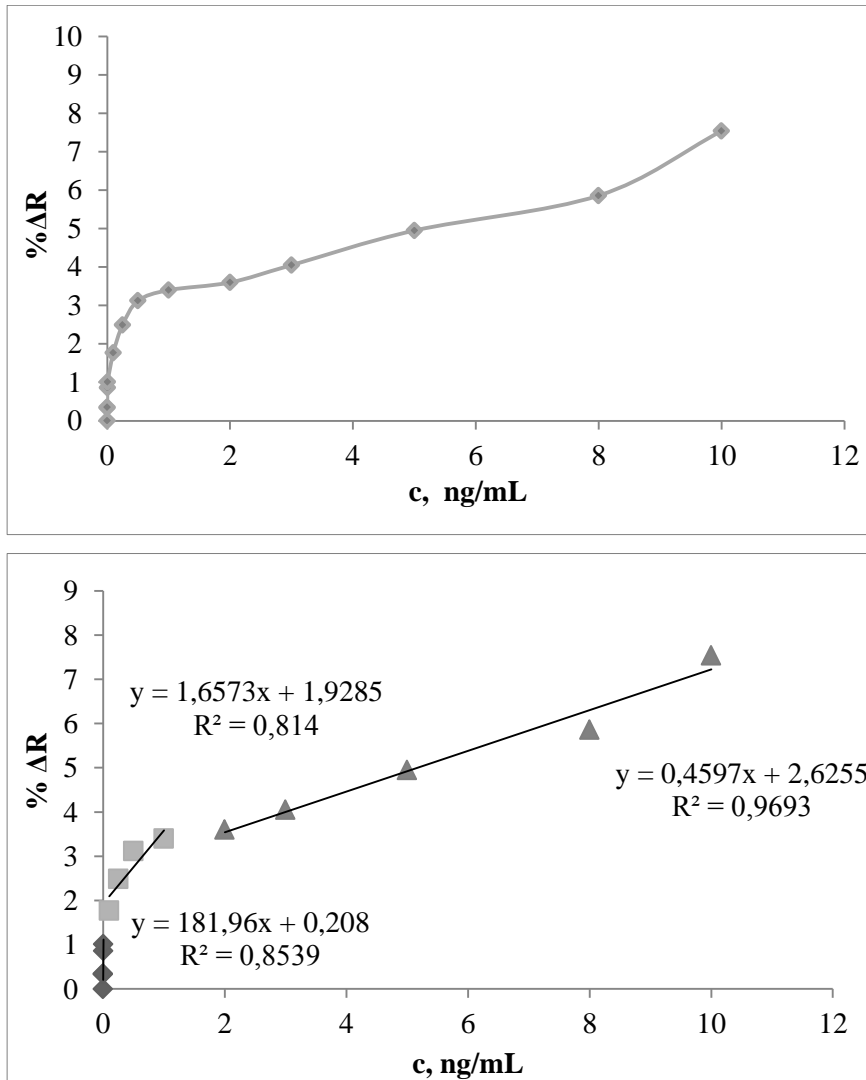
Şekil 4.10. AFB1-baskılanmış SPR nanosensör kinetik parametreleri; AFB1 derişimine bağlı kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.11. AFM1 baskılanmış SPR nanosensör ile AFM1 çözeltileri arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar; 0 ng.mL⁻¹-10 ng.mL⁻¹ geniş derişim aralığında alınan sinyallerin karşılaştırılması.

AFM1 tayini için 0.0001 ng.mL⁻¹-10 ng.mL⁻¹ derişim aralığında eş zamanlı sensör yanıtları izlenmiştir. Şekil 4.11'de AFM1 tayini için kaydedilen sensorgram verileri görölmektedir. AFM1 derişimi arttıkça aktif seçici bağlanma bölgelerine bağlanan anli derişimi ΔR_{max} değerini artırmaktadır. Bağlanma bölgeleri doygunluğa ulaştığında ise

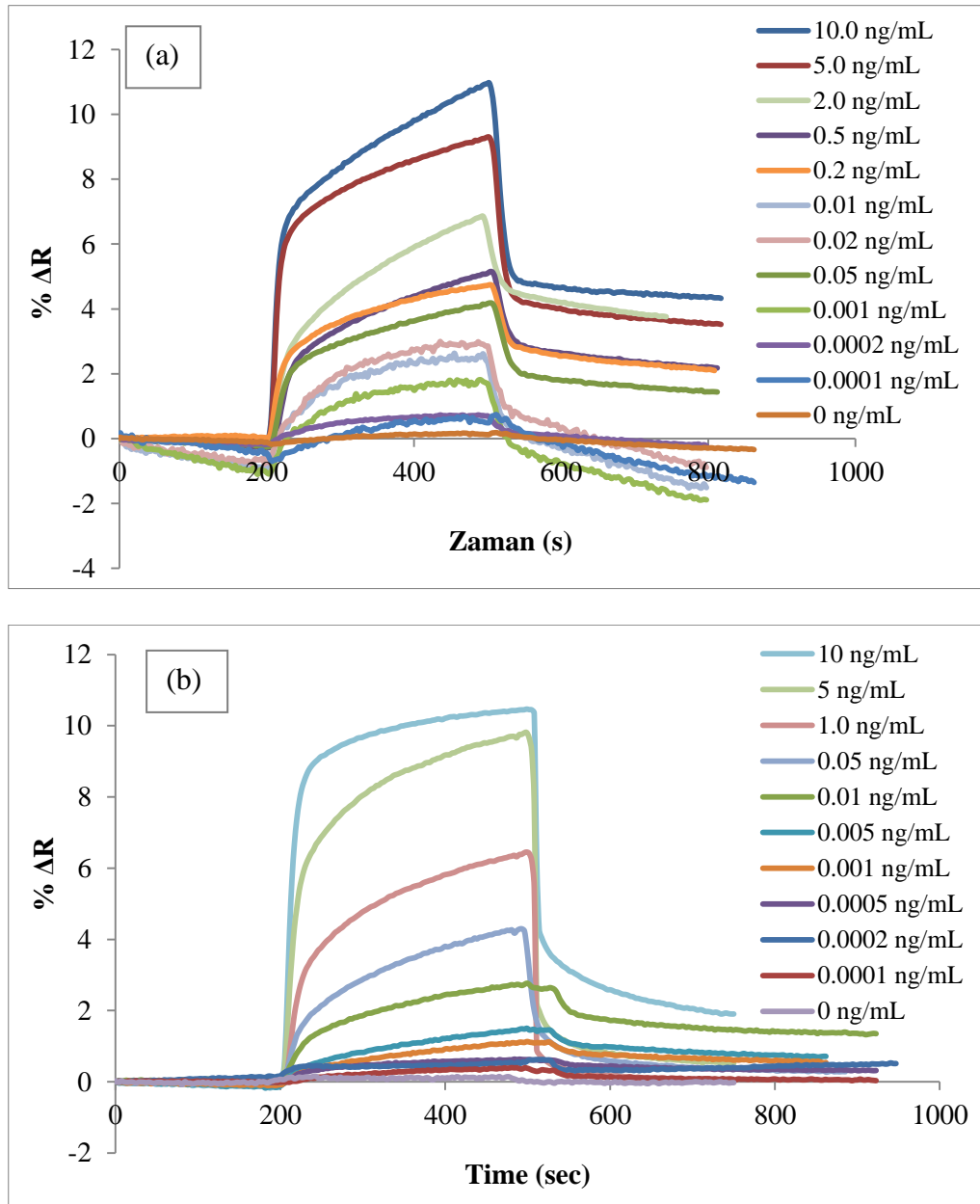
ΔR_{maks} değerinde çok büyük bir değişiklik meydana gelmemektedir. 0 ng.mL^{-1} ve $0.0025 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim aralığında sinyal ΔR değerleri doğru denklemi $y=181.96x+0.208$, $0.1-1.0 \text{ ng.mL}^{-1}$ aralığında doğru denklemi $y=1.6573x+1.9285$ ve $2.0-10.0 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim aralığında doğru denklemi ise $y=0.4597x+2.6255$ olarak hesaplanmıştır. $0-0.0025 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim aralığında %85 doğrulukta, $0.05 \text{ ng.mL}^{-1}-1.0 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim aralığında %81 doğrulukta ve $2.0 \text{ ng.mL}^{-1}-10.0 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişim aralığında yaklaşık %97 doğrulukta AFM1 tayinini yapılmaktadır. AFM1 derişimine bağlı kalibrasyon grafiği Şekil 4.12'de gösterilmektedir. AFM1 baskılanmış nanosensörün LOD değeri 0.4 pg.mL^{-1} olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. AFM1-baskılanmış SPR nanosensör kinetik parametreleri; AFM1 derişimine bağlı kalibrasyon grafiği.

4.5. Gıdalarda AFB1 Tayini

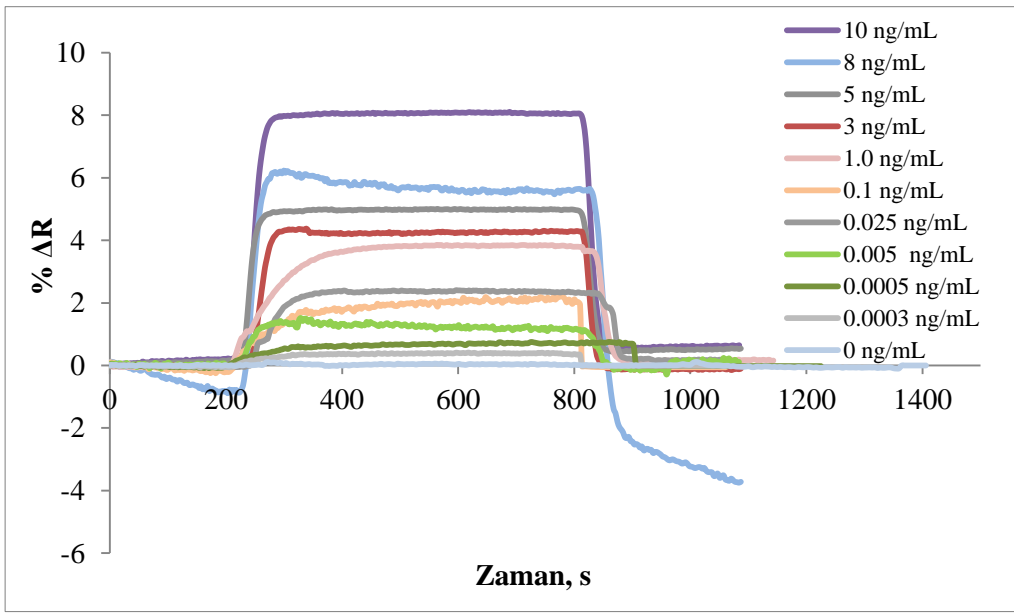
AFB1 baskılanmış SPR nanosensörü ile gıda örneklerinde AFB1 tayini çalışmaları AFB1 ile kirletilmiş fıstık ve mısır örneklerine uygulanmıştır. $0.0001-10 \text{ ng.mL}^{-1}$ arasında değişen AFB1 derişimleri fıstık ve mısır gıdası çözeltilerine eklenmiştir. AFB1 baskılanmış SPR nanosensör yanıtı değişikliklerinin, ani bir AFB1 derişimindeki artışa orantılı olarak değiştii gözlenmiştir. Fıstık örneği sensorgram grafiği Şekil 4.13(a)'da ve mısır örneği sensorgram grafiği Şekil 4.13(b)'de verilmektedir.



Şekil 4.13. Gıdalarda eş zamanlı ve doğrudan AFB1 tayini; (a) Fıstık örnekleri; (b) Mısır örnekleri.

4.6. Sütte AFM1 Tayini

AFM1 baskılanmış SPR nanosensörü ile çiğ süt örneklerinde AFM1 tayini çalışmaları AFM1 ile kirlenmiş çiğ süt örneklerine uygulanmıştır. 0 ng.mL^{-1} - 10.0 ng.mL^{-1} arasında değişen AFM1 derişimleri çiğ süt çözeltilerine eklenmiştir. AFM1 baskılanmış SPR nanosensör yanıtı değişikliklerinin, AFM1 derişimindeki artışa orantılı olarak değiştiği gözlenmiştir. Çiğ süt örneği sensorgram grafiği Şekil 4.14'de verilmektedir.

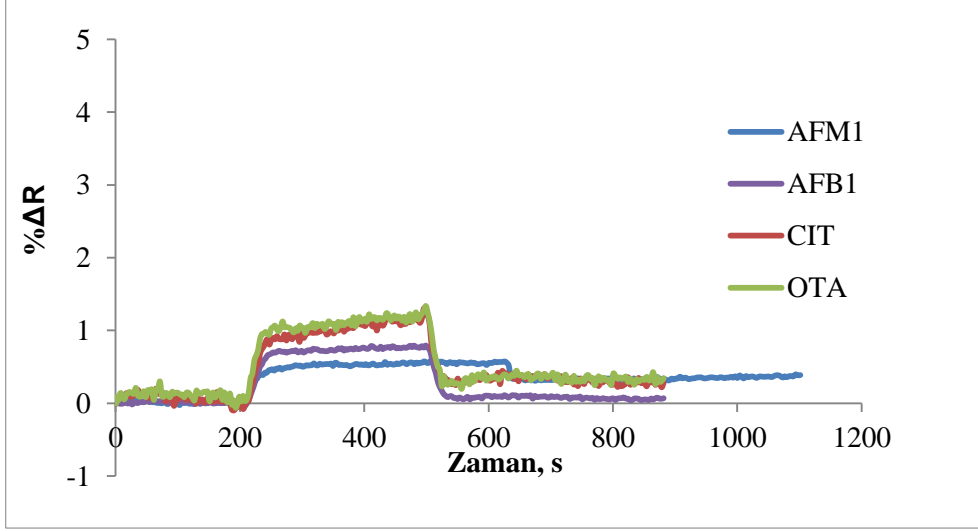


Şekil 4.14. Çiğ sütte eş zamanlı ve doğrudan AFM1 tayini; 0 - 10.0 ng.mL^{-1} derişim aralığında alınan sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.

4.7. Baskılanmamış Nanosensör İle Aflatoksin Tayini

AFB1 ve AFM1 baskılanmış nanosensörlerin seçiciliğinin ve baskılama etkinliğinin belirlenebilmesi için baskılanmamış nanosensör çipi hazırlanmıştır. 1.0 ng.mL^{-1} derişimde AFB1, AFM1, OTA ve CIT çözeltileri hazırlanmıştır ve NIP nanosensör sisteminden geçirilmiştir. ΔR değerlerinin oldukça düşük olması seçici bağlanma bölgelerinin çip yüzeyinde olmamasından kaynaklanmaktadır. NIP nanosensörü ile AFB1 için ΔR_{maks} değeri 0.8, AFM1 için 0.5, OTA için 0.99 ve CIT için 1.05 olarak kaydedilmiştir. Aflatoksin baskılanmış nanosensörlerin seçiciliğinin belirlenmesi için AFB1 ve AFM1 baskılanmış nanosensörler ile baskılanmamış nanosensörün sonuçları

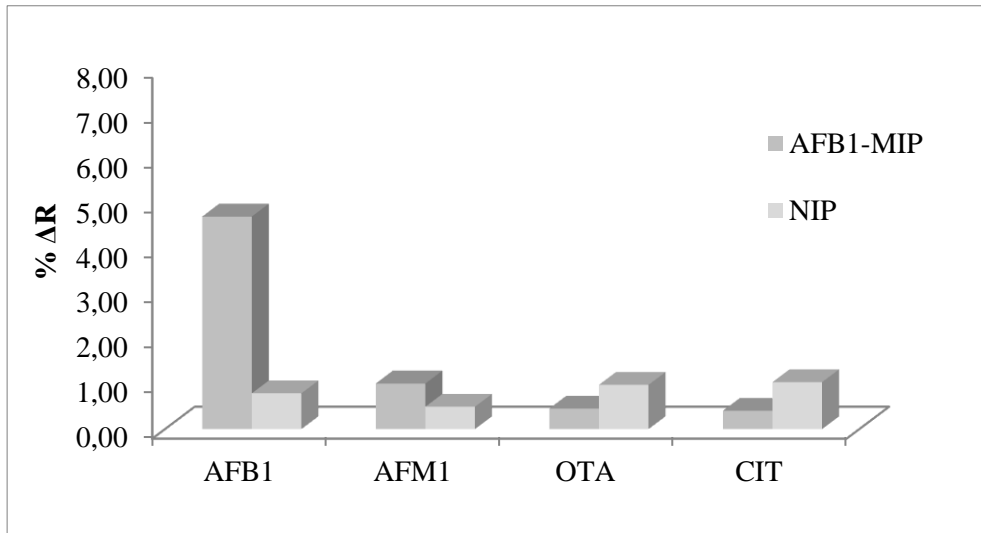
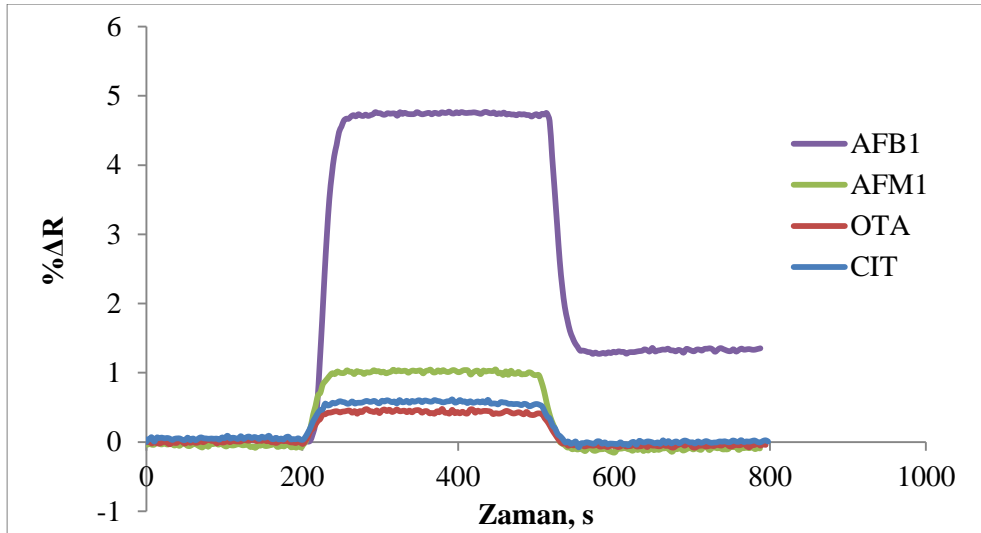
karşılaştırılmıştır. Şekil 4.15’de baskılanmamış nanosensörün seçicilik sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 4.15. Baskılanmamış nanosensörün seçicilik sonuçları; 1.0 ng.mL^{-1} derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.

4.8. Aflatoksin Seçicilik Çalışmaları

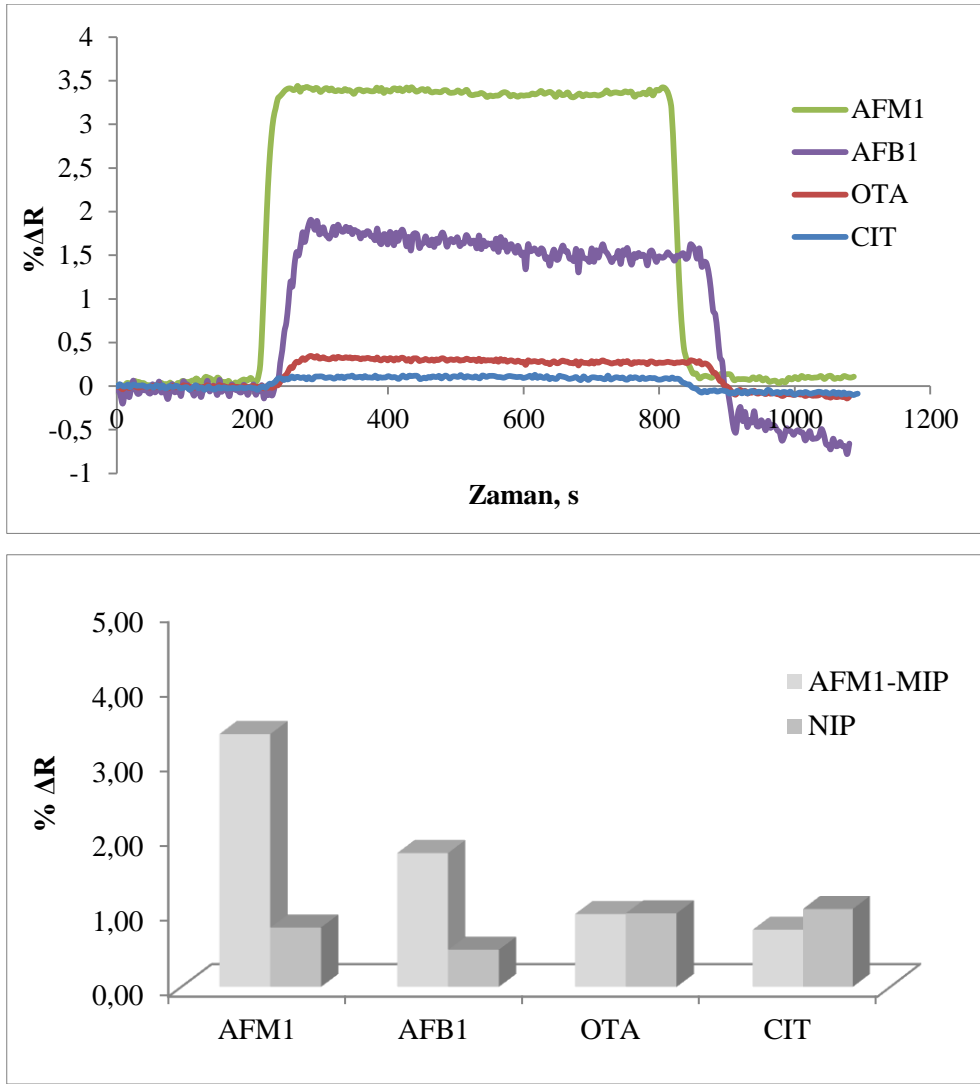
AFB1 ve AFM1 için hazırlanan çiplerin seçiciliklerinin belirlenmesi için ayrıca baskılanmamış NIP çip’de hazırlanmıştır. 1.0 ng.mL^{-1} derişiminde mikotoksin çözeltileri SPR sensör sistemine gönderilmiştir. Baskılamış ve baskılanmamış nanosensörlerden alınan sinyal değerleri AFB1 için Şekil 4.16’de ve AFM1 için Şekil 4.17’de karşılaştırılmıştır. AFB1 baskılamış nanosensörün baskılama faktörü 5.91 olarak hesaplanmıştır ve diğer mikotoksinlere karşı bağıl seçicilik kat sayılarının 1’den yüksek olduğu görülmüştür. AFM1 baskılamış nanosensörün baskılama faktörü 4.22 olarak hesaplanmıştır ve diğer mikotoksinlere karşı bağıl seçicilik kat sayılarının 1’den yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, seçicilik (k) ve bağıl seçicilik katsayısı (k') hesaplandığında sonuçlarının yüksek çıkması her bir SPR nanosensörün hedef moleküle karşı daha seçici ve hassas olduğu görülmektedir.



Şekil 4.16. AFB1 baskılanmış nanosensörün seçicilik sonuçları; 1.0 ng.mL^{-1} derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.

Çizelge 4.2. AFB1 baskılanmış SPR sensörün seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları.

Mikotoksin	MIP		NIP		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
AFB1	4.73	-	0.8	5.91	-
AFM1	1.02	4.64	0.5	1.60	2.89
OTA	0.46	10.28	0.99	0.81	12.72
CIT	0.41	11.53	1.05	0.76	15.14



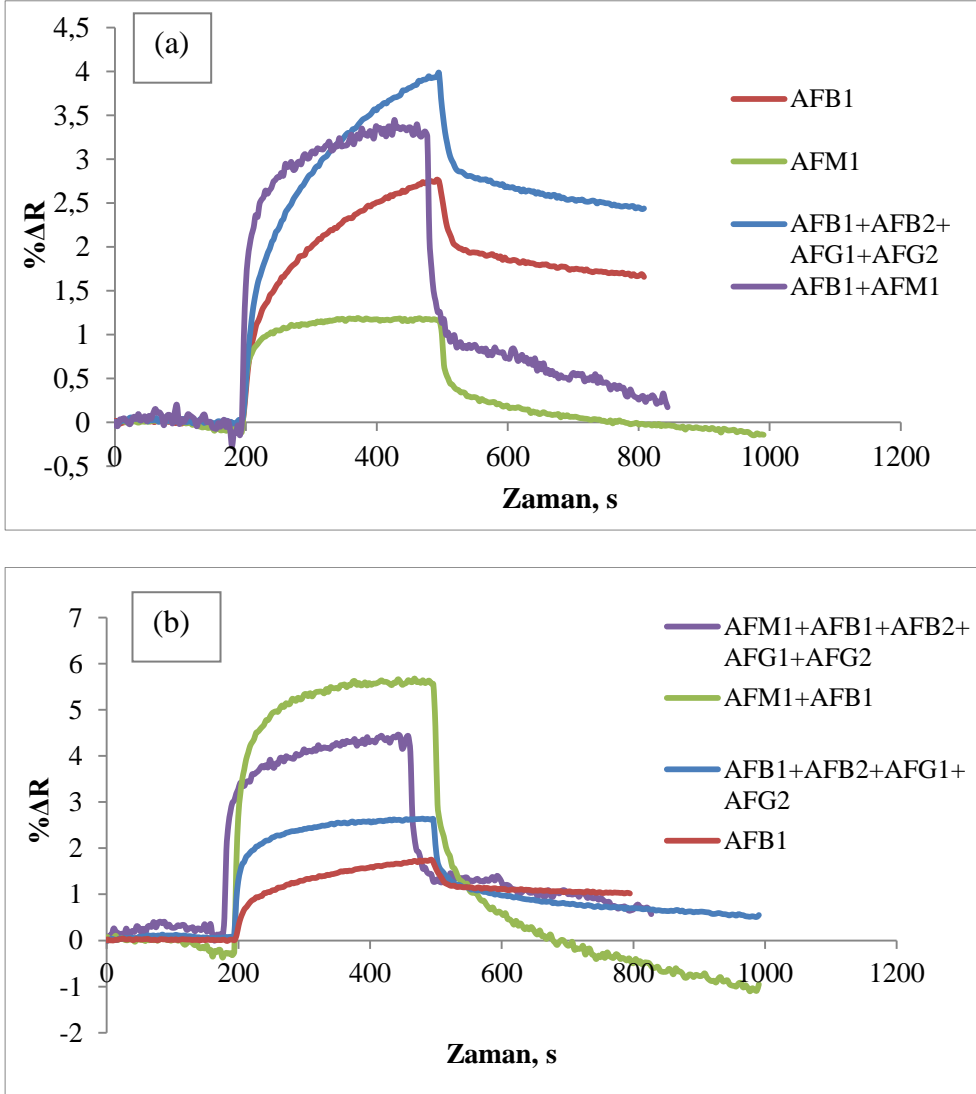
Şekil 4.17. AFM1 baskılanmış nanosensörün seçicilik sonuçları; 1.0 ng.mL^{-1} derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.

Çizelge 4.3. AFM1 baskılanmış SPR sensörün seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları.

Mikotoksin	MIP		NIP		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
AFM1	3,38	-	0,8	4,22	-
AFB1	1,80	1,87	0,5	1,6	1,17
OTA	0,98	3,44	0,99	0,80	4,26
CIT	0,77	4,38	1,05	0,76	5,76

Hazırlanan AFB1 ve AFM1 baskılanmış nanosensörlerin seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla ayrıca yarışmalı adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. 1.0 ng.mL^{-1} fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanmış 1.0 ng.mL^{-1} derişimindeki toplam aflatoksin,

tekli, ikili karışım çözeltileri kullanılmıştır. Nanosensörlerin bu aflatoksinlere verdiği tepki Şekil 4.18'deki sensorgramlarda görülmektedir.

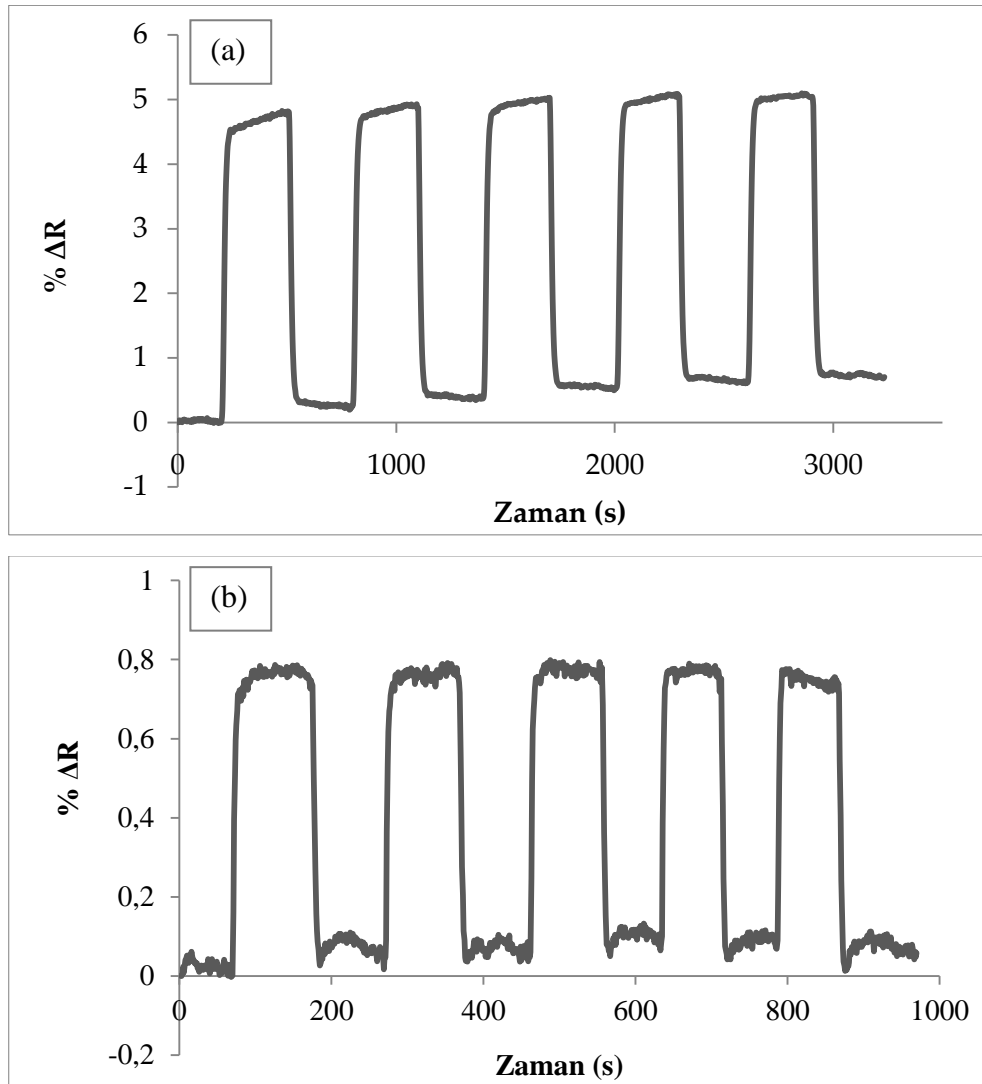


Şekil 4.18. (a) AFB1 baskılanmış nanosensörün seçicilik sonuçları; 0.1 ng.mL^{-1} derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması; (b) AFM1 baskılanmış nanosensörün seçicilik sonuçları; 0.1 ng.mL^{-1} derişime sahip mikotoksinlerden elde edilen sinyal yanıtlarının karşılaştırılması.

İkili ve tekli karışımlar incelendiğinde AFB1'in olduğu karışımlarda tek başına olduğu duruma göre ΔR değerinde artış görülmüştür. Bu durum, moleküllerin AFB1 ile birlikte olduğu zaman diğer aflatoksinlerin yarışmacı ajan olarak davrandığını ve ΔR değerinde artmaya sebep olduğunu göstermektedir. Yine aynı durumda AFM1'in olduğu karışımlarda yarışmacı ajanlara karşı ΔR değerini arttırdığı görülmektedir.

4.9. Tekrarlanabilirlik Sonuçları

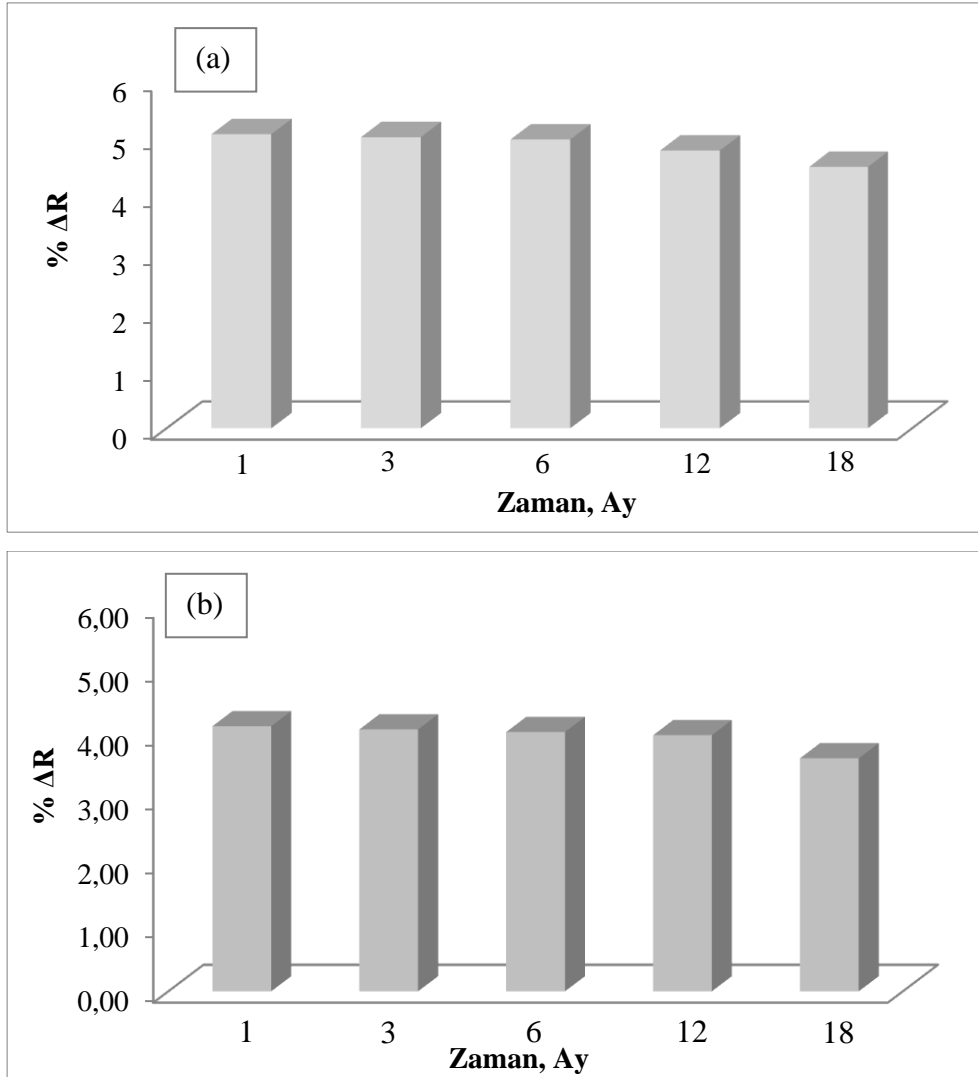
MIP temelli SPR nanosensörlerin sağladığı en büyük avantajlardan biri tekrarlanabilir olmasıdır. SPR temelli sensörler ile analitlerin doğrudan etiketsiz tayinini tekrarlanabilir olarak gözlemlemek ve sensör yanıtında çok önemli kapasite değişimlerinin gözlenmemesi bu avantajın önemini göstermektedir. Bu amaçla aflatoxin baskılanmış polimer kaplı nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 0.5 ng.mL^{-1} AFB1 ve $0.0025 \text{ ng.mL}^{-1}$ AFM1 çözeltileri SPR sistemine tekrarlı (5 kez) bir şekilde verilmiş ve sonuçlar Şekil 4.19’da gösterilmektedir. Görüldüğü gibi hem AFB1 baskılanmış hem de AFM1 baskılanmış nanosensörlerde sinyal yanıtında azalma gözlenmeden ard arda aflatoxin tayini gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.19. (a) AFB1 baskılanmış ve (b) AFM1 baskılanmış çiplerin tekrarlanabilirlik sonuçları.

4.10. Raf Ömrü Belirleme Çalışmaları

Raf ömrü çalışmaları moleküler baskılanmış polimerler kaplı SPR çiplerinin hazırlanmasından sonra ilk yapılan aflatoksin tayini sonrası 3, 6, 12 ve 18 ay olarak planlanmıştır. 0.5 ng.mL^{-1} AFB1 ve 3 ng.mL^{-1} AFM1 derişimde her bir aflatoksin için hazırlanan SPR sensör sistemi yanıtı kaydedilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Şekil 4.20'de SPR sensörlerin farklı zamanlarda kullanımları sonrasında sinyal değişimlerinin kararlılığı görülmektedir. Buna göre AFB1 ve AFM1 baskılanmış nanosensörlerin raf ömrü kararlılığı sırasıyla ve %88 ve %87.92'dir.



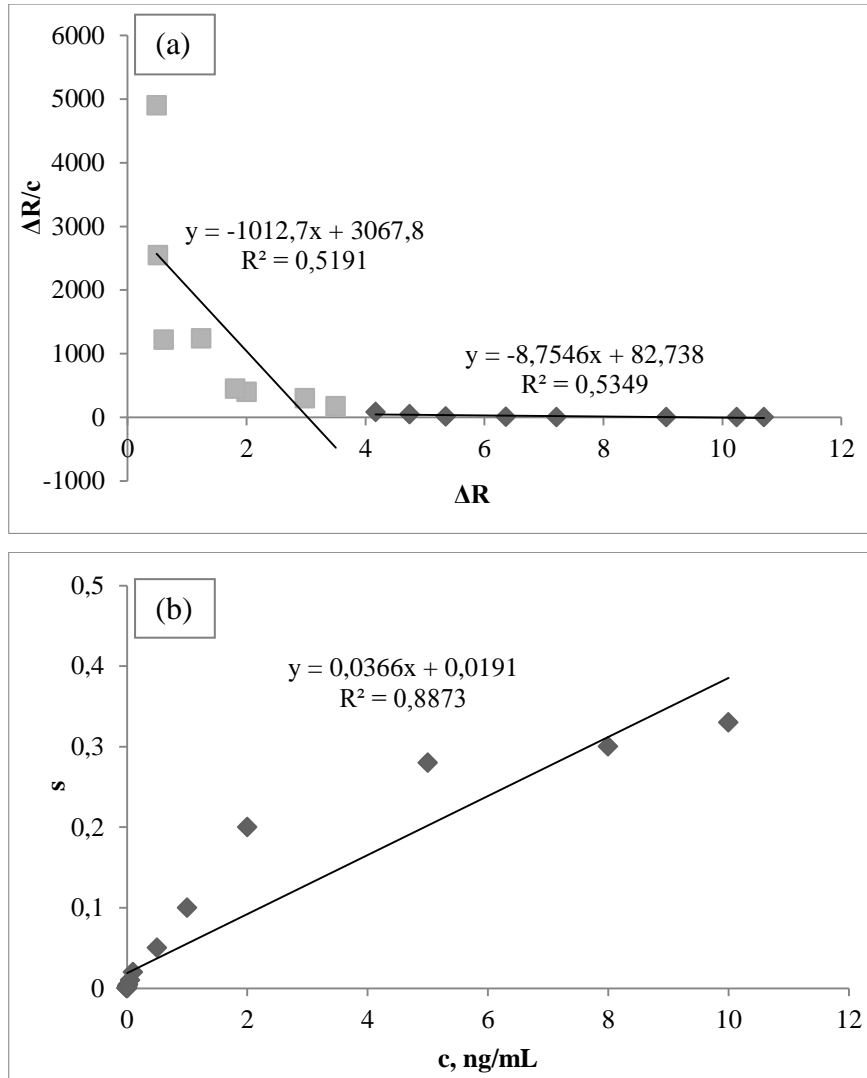
Şekil 4.20. Aflatoksin baskılanmış SPR çiplerin raf ömrü sonuçları: (a) AFB1 baskılanmış; (b) AFM1 baskılanmış.

Moleküler baskılanmış polimer temelli SPR nanosensörlerde, polimer filmin sağlamlığı, çevresel şartlara karşı kararlılığı ve uzun raf ömrüne sahip olmaları tanıma yüzeyi

olarak biyolojik moleküllerin kullanıldığı sensörlere göre çok daha uzun süre tekrar kullanılabilme yeteneği göstermektedir.

4.11. Kinetik Modeli

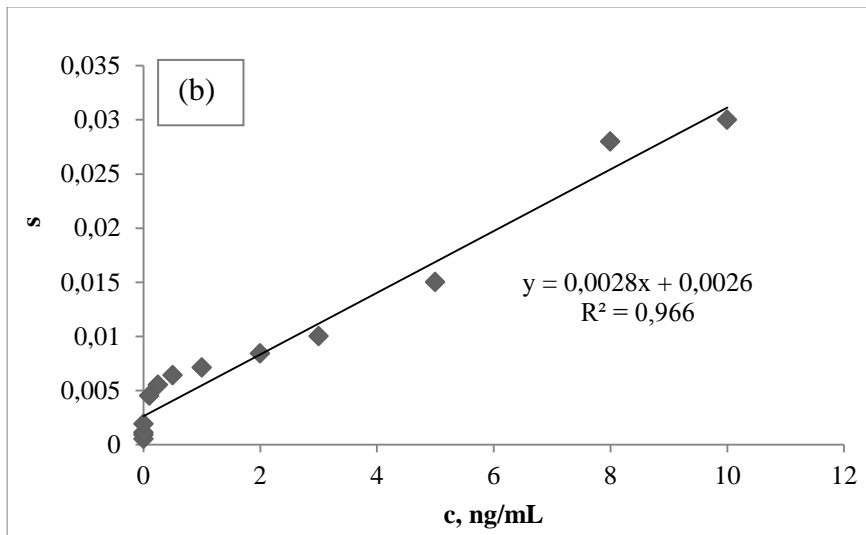
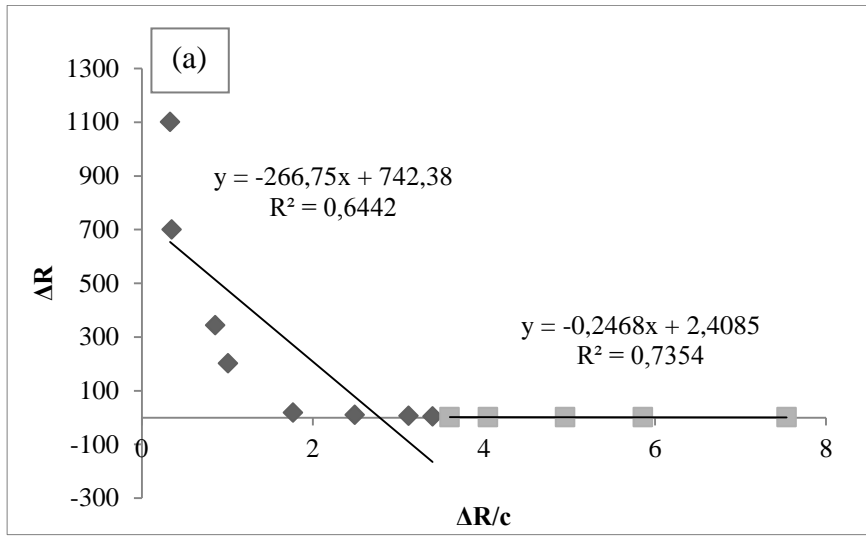
Aflatoksin baskılanmış SPR nanosensörlerin kinetik analizi, hedef molekül-polimer film etkileşimlerini belirlemek için kullanılmıştır. Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi grafikleri verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden elde edilen ΔR_{\max} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 3.4 ve Çizelge 4.5’de özetlenmiştir.



Şekil 4.21. AFB1 baskılanmış nanosensör kinetik hız parametrelerinin belirlenmesi için matematiksel yaklaşımlar; (a) Denge kinetik (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik analizi.

Çizelge 4.4. AFB1-MIP SPR nanosensörün kinetik hız sabitleri verileri.

Bağlanma kinetik analizi		Denge analizi (Scathard)	
k_a (ng.mL ⁻¹) ⁻¹ .s ⁻¹	0.036	ΔR_{max}	9.45
k_d , s ⁻¹	0.019	K_A (ng.mL ⁻¹) ⁻¹	8.75
K_A (ng.mL ⁻¹) ⁻¹	1.89	K_D ng.mL ⁻¹	0.11
K_D ng.mL ⁻¹	0.52	R^2	0.5349
R^2	0.8873		



Şekil 4.22. AFM1 baskılanmış nanosensör kinetik hız parametrelerinin belirlenmesi için matematiksel yaklaşımlar; (a) Denge kinetik (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik analizi.

Çizelge 4.5. AFM1-MIP SPR nanosensorün kinetik hız sabitleri verileri.

Bağlanma kinetik analizi		Denge analizi (Scathard)	
k_a (ng.mL ⁻¹).s ⁻¹	0.0028	ΔR_{max}	10
k_d (s ⁻¹)	0.0026	K_A (ng.mL ⁻¹) ⁻¹	0.24
K_A (ng.mL ⁻¹) ⁻¹	1.076	K_D ng.mL ⁻¹	4.16
K_D ng.mL ⁻¹	0.92	R^2	0.7354
R^2	0.966		

4.12. Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Bir adsorpsiyon izotermi, sınırlı ve serbest konukların denge derişimleri ile belirli bir derişim aralığı üzerindeki ilişkinin bir ölçüsüdür (Diltemiz ve Ecevit, 2019). Bu nedenle, AFM1 ve AFB1 analitleri polimer film kaplı SPR çip arasındaki etkileşim modeli, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modelleri kullanılarak araştırılmıştır. Uygulanan doğrusal model aşağıdaki denklemler kullanılarak belirlenebilmektedir:

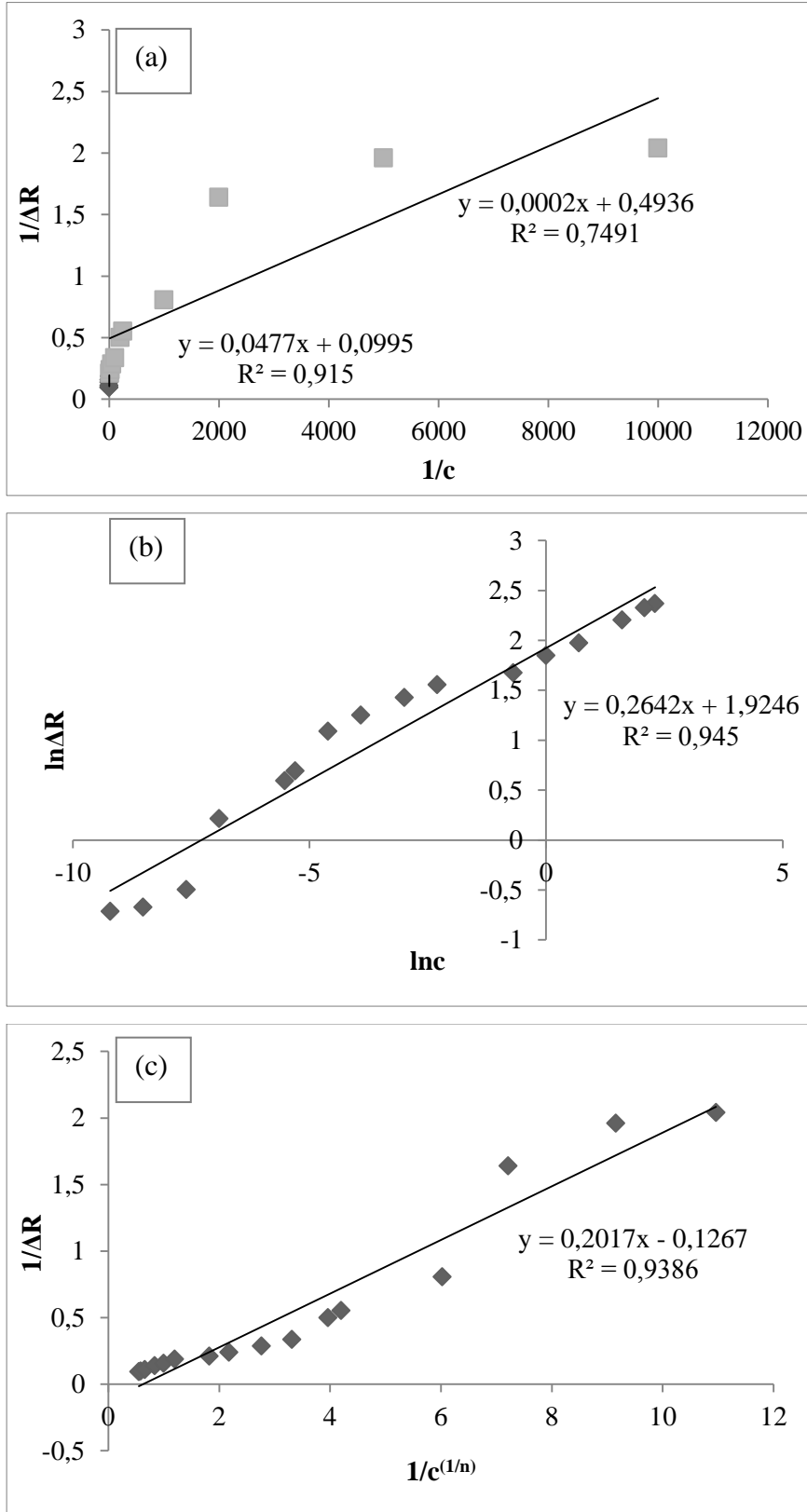
$$\text{Langmuir} \quad \Delta R = \left\{ \frac{\Delta R_{max} [C]}{K_D} + [C] \right\} \quad (4.3.)$$

$$\text{Freundlich} \quad \Delta R = \{ \Delta R_{maks} C^{1/n} \} \quad (4.4.)$$

$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta R = \left\{ \frac{\Delta R_{max} [C]^{1/n}}{K_D} + [C]^{1/n} \right\} \quad (4.5.)$$

Aflatoksin baskılanmış polimer film kaplı SPR çiplerin homojenliğini belirlemek için adsorpsiyon modelleri adsorpsiyon verilerine uygulanabilir. Langmuir modeli, polimer filmin, tek bir afinite sabit değeri olan homojen bağlanma bölgelerine sahip olduğunu varsaymaktadır. Freundlich modeli, polimer filmin heterojen bağlanma davranışını temsil etmektedir. Langmuir-Freundlich modeli, polimer filmin heterojen karakterini dikkate alır ve yüksek derişim bölgelerinde adsorpsiyon izotermelerinin doyma davranışını tarif etmek için uygundur. Langmuir denkleminin doğrusallığı Freundlich ve Langmuir-Freundlich denklemlerinden daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Aflatoksinler ve MIP film kaplı SPR çipler arasındaki etkileşimi açıklamak için korelasyon katsayısı ve doğrusallık verilerine göre en uygun model Langmuir izoterm

modelidir (Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7). Bu sonuçlara göre, AFB1 ve AFM1 hedef analitlerin bağlandığı MIP film kaplı SPR çipler homojen bağlama bölgelerine sahiptir.



Şekil 4.23. AFB1 baskılanmış nanosensör adsorpsiyon izoterm modelleri; (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

Çizelge 4.6. İzoterm parametreleri; AFB1 baskılanmış SPR nanosensör.

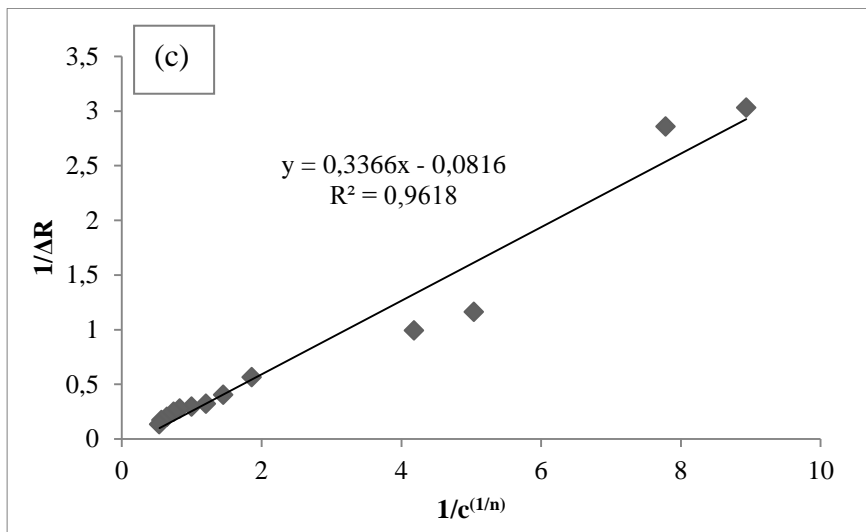
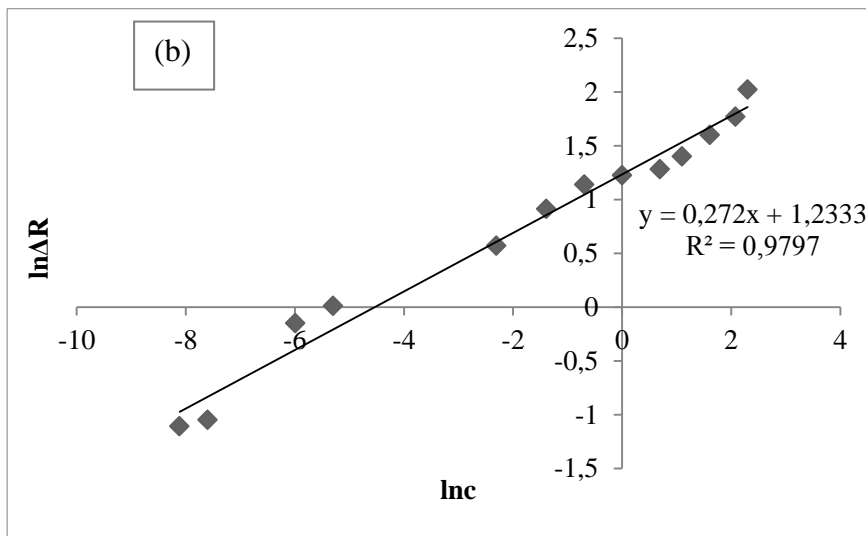
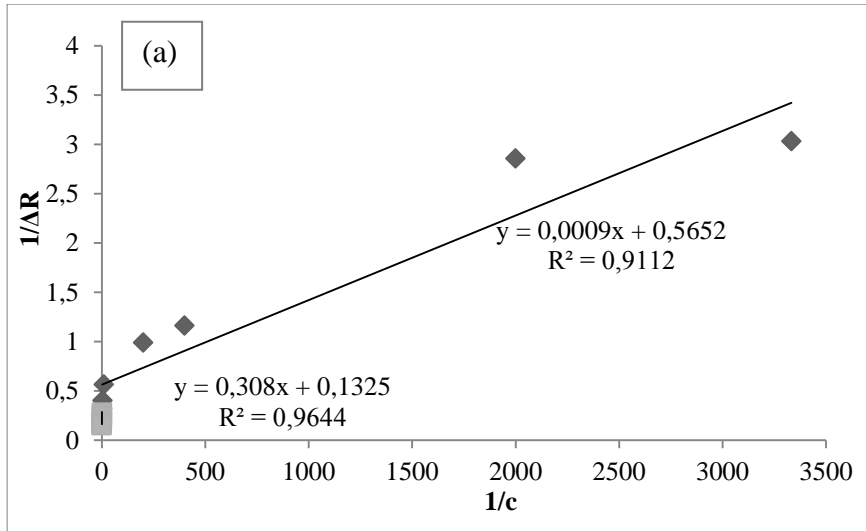
Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{\max}	10.01	ΔR_{\max}	6.82	ΔR_{\max}	8.33
K_D (ng/mL)	0.40	$1/n$	0.26	$1/n$	0.26
K_A (ng/mL) ⁻¹	0.04	R^2	0.945	K_D (ng/mL)	0.024
R^2	0.915			K_A (ng/mL) ⁻¹	41.66
				R^2	0.9386

Çizelge 4.6'ya göre AFB1 tayininde deneysel olarak elde edilen sonuçlar Langmuir modeli ile en uyumlu olduğu görülmektedir; AFB1 için $R^2=0.915$ ve $K_A=10.01$. Bu sonuçlar tasarlanan AFB1 baskılanmış nanosensör yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. İzoterm parametreleri; AFM1 baskılanmış SPR nanosensör.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{\max}	7.69	ΔR_{\max}	3.42	ΔR_{\max}	7.14
K_D (ng.mL ⁻¹)	2.30	$1/n$	0.27	$1/n$	0.27
K_A (ng.mL ⁻¹) ⁻¹	0.43	R^2	0.9797	K_D (ng.mL ⁻¹)	2.42
R^2	0.9644			K_A (ng.mL ⁻¹) ⁻¹	0.41
				R^2	0.9554

Çizelge 4.5 ve 4.7 birlikte incelendiğinde tasarlanan AFM1-baskılanmış nanosensöre en uygun izoterm modelinin Langmuir modeli olduğu görülmüştür. Buradan hesaplanan R_{\max} değeri deneysel değere (7.47 ng.mL⁻¹) oldukça yakındır. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 0.43 ng.mL⁻¹ ve 2.30 ng.mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.24. AFM1 baskılanmış nanosensör adsorpsiyon izoterm modelleri; (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

4.13. Gıda Örneklerinde Tayin Edilen Sonuçların HPLC ile Karşılaştırılması

Gıdalarda AFB1 ve AFM1 tayininde aflatoksin baskılanmış nanosensörlerin mevcut analitik sistemler ile karşılaştırıldığında kullanılabilirliği, güvenilirliği ve uyumlu sonuçların elde edildiğini göstermek için kirletilen gıda örnekleri HPLC ile ölçülmüştür. Gıda örneklerinde aflatoksin varlığı olmadığı belirlendikten sonra AFB1 ve AFM1 ile kirletilmiştir. Mısır, fıstık ve süt ekstrakte edilen örnekler için aflatoksine karşı spesifik immuno afinite kolonları (IAK) kullanılmıştır. Metot prensip olarak gıda örneklerinin homojenize edilmesi, uygun bir solvent kullanılarak matriksden safsızlıkların uzaklaştırılması ve aflatoksin ekstrakte edilmesiyle cihaza verilmesini kapsamaktadır. HPLC ile AFB1 ve AFM1 analizi için ACE C18 kolonu kullanılmıştır.

AFB1 baskılanmış nanosensörün % geri kazanım sonuçları ile fıstık ve mısırdaki elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. 0-10 ng.mL⁻¹ derişim aralığında kirletilmiş gıda örneklerinde aflatoksin geri kazanım sonuçları hesaplanmıştır. Çizelge 4.8. ve Çizelge 4.9.'da % geri kazanım sonuçları verilmektedir.

Çizelge 4.8.'de görüldüğü gibi fıstıkta AFB1 için % 99.0 ile % 105.34 arasında değişen % geri kazanım oranı mısırdaki AFB1 için % 96.63 ile % 105.94 arasında değişen % geri kazanım oranı için ise elde edilmiştir. Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi sütte AFM1 için % 103.97 ile % 110.05 arasında değişen % geri kazanım oranı için ise elde edilmiştir. Böylece AFB1 ve AFM1 baskılanmış polimer film temelli SPR nanosensör sisteminin geleneksel analitik yöntemlerle kıyaslandığında uyumlu sonuçlar elde edildiği ve hem AFB1 hem de AFM1 için düşük derişimlerde daha hassas sonuçların elde edilebildiğini göstermiştir. Sonuçlar gerçek numunelerde AFB1 ve AFM1 için önerilen altın nanopartikül gömülü moleküler baskılanmış polimer film temelli düşük moleküler ağırlıklı analite duyarlı bir SPR nanosensörünün kabul edilebilir doğruluğunu göstermektedir. Bu analizler, gerçek tarım ve süt ürünlerinde AFB1 ve AFM1 tayini için kurulan biyoalgılama sisteminin uygulanabileceğini göstermiştir.

Çizelge 4.8. Aflatoksin B1'in belirlenmesi için SPR ve HPLC yöntemleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

Örnek	Eklenen (ng.mL ⁻¹)	Bulunan SPR (ng.mL ⁻¹)	Geri kazanım (%)	Bulunan HPLC (ng.mL ⁻¹)	Geri kazanım (%)
Fıstık	0	n.a.	-	n.a.	-
	1.0	0.94	105.34	1.015	101.5
	5.0	5.05	99.00	4.325	86.5
	10.0	9.96	100.37	9.96	99.6
Mısır	0	n.a.	-	n.a.	-
	1.0	1,01	98.74	1.02	102
	5.0	4,71	105.94	5.32	106.4
	10.0	10,34	96.63	9.12	91.2

Çizelge 4.9. Aflatoksin M1'in belirlenmesi için SPR ve HPLC yöntemleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

Örnek	Eklenen (ng.mL ⁻¹)	Bulunan SPR (ng.mL ⁻¹)	Geri kazanım (%)	Bulunan HPLC (ng.mL ⁻¹)	Geri kazanım (%)
Süt	0	n.a.	-	n.a.	-
	1.0	0.90	110.05	1.015	101.5
	5.0	4.80	103.97	4.84	96.8
	10.0	9.25	108.021	10.12	101.2

4.14. Aflatoksin Baskılanmış Sensörler

Çizelge 4.10'da farklı sensör tipleri ile geliştirilen tanıma yüzeyleri geniş derişim aralığında yapılan aflatoksin tayini ve elde edilen tayin sınırları gösterilmektedir. Aflatoksin tayini için moleküler baskılama temelli sensörler ile yapılan çalışmalar ile tez kapsamında alınan sonuçları değerlendirildiğinde literatür ile uyumlu ve hatta daha düşük tayin sınırlarının elde edildiği bir strateji geliştirildiği görülmektedir.

Wang ve ark., AFB1 tayini için hassas ve seçici baskılanmış elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. Fonksiyonel monomer olarak o-fenilendiamin kullanılmıştır. Camsı

karbon elektrot yüzeyinde fonksiyonel çok duvarlı karbonnanotüp ve Au/Pt metal nanopartiküller varlığında AFB1 baskılanmış polimer film sentezlenmiştir. 1×10^{-10} – 1×10^{-5} mol.L⁻¹ derişim aralığında AFB1 tayini gerçekleştirilmiş ve tayin sınırı 0.03 nmol.L⁻¹ olarak bulunmuştur.

Guo ve ark., moleküler baskılama tekniğini ile kuantum noktaları (QD) teknolojisi ile birleştirerek AFB1'in hızlı ve spesifik olarak tanınması için yeni ve hassas bir floresan sensör geliştirdiler. MIP film kaplı CdTe QD floresan prob yüzey baskılama yöntemi ile sentezlenmiştir. 80–400 ng.g⁻¹ geniş derişim aralığında AFB1 tayini gerçekleştirilmiş ve tayin sınırı 4 ng.g⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Sergeyeva ve ark., AFB1 tayini için akıllı telefon temelli optik biyomimetik sensör sistemi geliştirmişlerdir. Tanıma elemanı olarak moleküler baskılanmış polimer membranlar akrilamid (AA), 2-akrilamido-2-metil-1-propansulfonik asit (AMPSA), allilamin, 2-(dietilamino)etilmetakrilat (DEAEM), N,N'-metilenbisakrilamid (MBAA) farklı fonksiyonel monomerler kullanılarak 1:2 oranında hazırlanmıştır. En iyi sonuçlara akrilamid fonksiyonel monomeri ile varılmıştır. 20–100 ng.mL⁻¹ derişim aralığında AFB1 tayini gerçekleştirilmiştir ve tayin sınırı 15 ng.mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Bir diğer çalışmada Gutierrez ve ark., kapasitif bir biyosensör kullanarak AFB1'in saptanması için bir strateji geliştirdiler. Bu kapsamda AFB1'e karşı yüksek seçiciliğe sahip bölgeleri proteinleri kullanarak biyobaskılama yoluyla üretmişlerdir. Ovalbumin kullanıldığı zaman 3.2×10^{-6} – 3.2×10^{-9} M derişim aralığında AFB1 tayini için doğrusal bi ilişki gözlenmiştir. Tayin sınırı 6.3×10^{-12} M olarak kaydedilmiştir.

Son olarak Jiang ve ark., AFB1 tayini için hassas elektrokimyasal moleküler baskılanmış sensör geliştirdiler. AFB1 tanıma bölgeleri için p-aminotiyofenol (PATP)-fonksiyonelleştirilmiş AuNPs ile metal-organik frameworks (MOFs) sistemi tasarlanmıştır. Bu çalışmada 3.2 fM–3.2 µM derişim aralığında AFB1 tayini gerçekleştirmiştir ve tayin sınırı 1.0 fM olarak belirtilmiştir.

Bu tez çalışmasında AFB1 ve AFM1 tayini için altın nanopartikül gömülü moleküler baskılanmış nanofilm kaplı SPR nanosensörler hazırlanmıştır. 0 ng.mL⁻¹ ve 10 ng.mL⁻¹ derişim aralığında hem sulu çözeltilerde hem de gıda örneklerinde aflatoksin tayini gerçekleştirilmiştir. Tayin sınırı AFB1 için 1.04 pg.mL⁻¹ ve AFM1 için 0.4 pg.mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. Moleküler baskılama temelli aflatoksin sensörler.

Sensör Tipi	Tamma yüzeyi	Derişim aralığı	LOD değeri	Ref.
Elektrokimyasal (AFB1)	Karbonnanotüp-Au/Pt bimetalik nanopartikül MIP film	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	0.03 nmol.L^{-1}	(Wang ve ark., 2014)
Elektrokimyasal (AFB1)	p-aminotiyofenol (PATP)-fonksiyonelleştirilmiş AuNPS	$3.2 \text{ fM} - 3.2 \text{ } \mu\text{M}$	1.0 fM (0.3 pg.L^{-1})	(Jiang ve ark., 2015)
Kapasitif biyosensör (AFB1)	Biyobaskılama	$3.2 \times 10^{-6} - 3.2 \times 10^{-9} \text{ M}$	$6.3 \times 10^{-12} \text{ M}$	(Gutierrez, Hedström, & Mattiasson, 2016)
Florimetrik (AFB1)	Akrilamid temelli moleküler baskılanmış polimer membranlar	$20 - 100 \text{ ng.mL}^{-1}$	15 ng.mL^{-1}	(Sergeyeva ve ark., 2019)
Fluresans (AFB1)	Moleküler baskılama polimer kaplı CdTe kuantum noktalar (MIP@CdTe QDs)	$80 - 400 \text{ ng.g}^{-1}$	4.0 ng.g^{-1}	(Guo ve ark., 2019)
SPR (AFB1 ve AFM1)	AuNPs gömülü moleküler baskılanmış polimer nanofilm	$0 - 10 \text{ ng.mL}^{-1}$	1.04 pg.mL^{-1} 0.4 pg.mL^{-1}	<i>Bu tez çalışması</i>

5. YORUM

Fitopatogenik ve mikotoksijenik mantar kalıntıları dünyanın her yerinde tarım ve gıda güvenliği için her zaman en önemli kaygılardan biri olmuştur. Tez kapsamı hedeflerinde belirtildiği gibi hâlihazırda her geçen gün mevcut aflatoksin kirliliği yaşam kalitesini etkilemektedir. Belirli nem ve sıcaklık koşulları altında mahsullerde oluşan bu ikincil metabolitlerin hızlı ve güvenilir tayin metodlarının geliştirilmesi çok önemlidir.

Günümüzde moleküler baskılama teknolojileri yakından takip edilmiş ve bu toksinlere karşı hızlı ve etkili tayin yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılabilecek öncül çalışma niteliğinde MIP temelli SPR nanosensörler hazırlanmış ve bunların kullanılabilirliği gösterilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı analitlerin daha hassas ve seçici tayin edilmeleri için altın nanopartikül gömülmüş moleküler baskılanmış polimer film kaplı duyarlılığı artırılmış SPR çipleri dizayn edilmiştir. Altın nanopartikül içeren nanofilm nedeniyle sensörün hassasiyeti büyük ölçüde iyileştirilmiştir; önerilen sensörler, moleküler baskılanmış polimer (MIP) film sayesinde AFB1 ve AFM1'e karşı mükemmel seçicilik sergilemiştir. Mısır ve fıstıkta AFB1 ve çiğ süt ürünlerinde AFM1 başarılı bir şekilde tayin edilmiştir.

Altın nanopartiküller Turkhevic yöntemi kullanılarak başarıyla sentezlenmiştir ve Zeta-boyut ve TEM analizi ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Zeta-boyut analizi ile altın nanopartiküllerin boyut dağılımı 13.58 ± 1.7 ve PDI değeri 0.600 bulunmuştur.

TEM analizi ile altın nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve boyut dağılımının homojen olduğu ve hem tek altın nanopartikülleri hem de küçük kümeleşmeler içerdiği görülmüştür. AuNP'lerin ortalama boyutları 12.5 nm ve 16.66 nm olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar zeta boyut analizi ile karşılaştırıldığında nanopartiküllerin başarılı bir şekilde sentezlendiği gösterilmiştir.

SPR çip yüzeyine allil modifikasyonu allil merkaptan çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pirana çözeltisi ile temizlenen SPR çip altın yüzeyine allil merkaptan çözeltisi damlatılmış ve bir gece boyunca bekletilmiştir.

Allil modifikasyonu yapılan çiplerin yüzeyine AFB1 ve AFM1 baskılanmış polimer film kaplanarak SPR nanosensörler hazırlanmıştır ve aflatoksin baskılanmış çiplerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmiş çiplerin yüzey morfolojileri,

FTIR-ATR, taramalı elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskobu, temas açısı, ellipsometre cihazları kullanılarak karakterize edilmiştir.

AFB1 ve AFM1 baskılanmış çiplerin FTIR-ATR analizi ile HEMA monomerinin yapısında bulunan; –NH ve –C=O gruplarının gerilme bantları sırasıyla 3440 cm⁻¹ ve 1722 cm⁻¹ civarlarında görülmektedir. MAPA monomerinin yapısında bulunan aromatik halkadan kaynaklı 1454 cm⁻¹ civarındaki C=C gerilmeleri bantları ve 1148 cm⁻¹ civarında aromatik C-H halka bükülmesi piki spektrumlar arasındaki farklı fonksiyonel grupları göstermektedir.

Aflatoksin baskılanmış altın yüzeylerin morfolojik karakterizasyonu için AFM ile üç boyutlu görüntüleri alınmıştır. Boş SPR çipin yüzey derinliği 0.80 nm olarak tespit edilmiştir. Allil modifikasyonu, AFM1 baskılanmış, AFB1 baskılanmış ve baskılanmamış çiplerin ortalama pürüzlülüğü 1.87, 8.08, 9.4 ve 4.84 nm olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar aflatoksin baskılanmış ve baskılanmamış nanofilmlerin SPR çip altın yüzeyine homojen bir şekilde kaplandığını göstermektedir.

Modifiye edilmiş SPR çiplerin yüzeyine 1 damla su damlatılarak Sessile Drop yöntemiyle temas açısı belirlenmiştir. Boş altın yüzey, allil modifikasyonu, AFM1 baskılanmış, AFB1 baskılanmış ve baskılanmamış çip yüzeylerin temas açısı ölçümleri sırasıyla 69.5°, 58.1°, 72.8°, 71.3° ve 74.9° olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre boş altın yüzey, allil modifikasyonu yapılan çip yüzeyi ile karşılaştırıldığında yüzeye hidrofilik grupların bağlandığı açının azalmasıyla görülmüştür. Yüzeyi polimer film kaplı çiplerde temas açısı arttığı görülmüştür.

Baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzey morfolojileri ve yapısı taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Tasarlanan çip yüzeylerinin morfolojisi ve yansıtma görüntüleri alınarak çip yüzeyinin polimer film kaplanması değerlendirilmiştir. SEM analizine göre, altın yüzeyin AFB1 baskılanmış polimer film kaplanması yaklaşık 128 nm kalınlığında olduğu ve altın yüzeyin üzerinde hareketsiz bulunan polimer film homojen bir şekilde kaplandığı görülmüştür. Ayrıca altın yüzeyin AFM1 baskılanmış polimer film kaplanması yaklaşık 108 nm kalınlığında olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre polimer film kalınlığının ~128-108 nm olduğu ve polimer filmin çip altın yüzeylerine homojen bir şekilde kaplanmasının başarılı bir şekilde gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.

Hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış SPR çiplerin ortalama yüzey kalınlık ölçümleri Elipsometre cihazı ile karakterize edilmiştir. Allil modifikasyonu, AFM1 baskılanmış, AFB1 baskılanmış ve baskılanmamış çiplerin yüzey polimer kalınlıkları 25 nm, 88 nm, 82 nm and 75 nm olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçların değişimi aflatoksin baskılanmış ve baskılanmamış nanofilmlerin SPR çip altın yüzeyine uygun bir şekilde kaplandığını göstermektedir.

Aflatoksin baskılanmış SPR sensör çiplerin karakterizasyon çalışmaları sonucunda nanopolimer film kaplı çipler ile sulu çözeltilerde ve gıdalarda aflatoksin analizine geçilmiştir.

Sensör yanıt sinyali ile $0.0001 \text{ ng.mL}^{-1}$ ila 10.0 ng.mL^{-1} arasında değişen AFB1 derişimlerinin logaritması arasında doğrusal bir ilişki kaydedilmiştir.

Sensör yanıt sinyali ile $0.0003 \text{ ng.mL}^{-1}$ ila 10.0 ng.mL^{-1} arasında değişen AFM1 derişimlerinin logaritması arasında doğrusal bir ilişki kaydedilmiştir.

AFB1 ve AFM1 için tayin sınırı sırasıyla 1.04 pg.mL^{-1} ve 0.4 pg.mL^{-1} olarak hesaplanmıştır. Aflatoksin baskılanmış farklı sensör siteleri ile sonuçlar karşılaştırılmıştır. Derişim aralığı ve tayin sınırlarının literatür ile uyumlu sonuçlar gösterdiği elde edilmiştir.

Fıstık ve mısır örneklerinde AFB1'i tayin etmek için öncelikle gıda örnekleri hazırlanmış ve AFB1 ile kirletilmiştir. 0 ng.mL^{-1} - 10 ng.mL^{-1} derişim aralığında AFB1 tayini gerçekleştirilmiştir.

Çiğ sütte AFM1 tayini için süt örneği hazırlandıktan sonra AFM1 ile kirletilmiştir. 0 ng.mL^{-1} - 10 ng.mL^{-1} derişim aralığında AFM1 tayini gerçekleştirilmiştir.

SPR nanosensörde tarım ürünlerinde AFB1 ve çiğ sütteki AFM1'in ~8 dakika analiz süresiyle çok hassas bir şekilde tayini gerçekleştirilmiştir.

MIP temelli SPR nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 0.5 ng.mL^{-1} ve $0.0025 \text{ ng.mL}^{-1}$ derişimde AFB1 ve AFM1 çözeltileri SPR sistemine 5 kez tekrarlı verilmiştir ve sinyal yanıtındaki kararlılık gözlenmiştir.

Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları, MIP nanosensörün NIP nanosensöre kıyasla AFB1'e oldukça seçici bir şekilde tayin edebildiğini göstermektedir. Baskılama faktörü 5.91 kat olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bağıl seçicilik (k') katsayısının 1'in üzerinde olması, aflatoksin baskılama işleminin etkinliğini göstermektedir.

Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları, MIP nanosensörün NIP nanosensöre kıyasla AFM1'e oldukça seçici bir şekilde tayin edebildiğini göstermektedir. Baskılama faktörü 4.22 kat olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bağıl seçicilik (k') katsayısının 1'in üzerinde olması, aflatoxin baskılama işleminin etkinliğini göstermektedir.

AFB1 ve AFM1 baskılanmış nanosensörlerin seçicilikleri ayrıca okratoksin A ve sitrinin mikotoksinlerle karşılaştırılmıştır. AFB1 baskılanmış nanosensörün AFM1'e karşı 2.89, okratoksin A'ya karşı 12.72 ve sitrinine karşı 15.14 kat daha seçici olduğu hesaplanmıştır. AFM1 baskılanmış nanosensörün ise AFB1'e karşı 1.17, okratoksin A'ya karşı 4.26 ve sitrinine karşı 5.76 kat daha seçici olduğu hesaplanmıştır.

Raf ömrü çalışmaları moleküler baskılanmış polimerler kaplı SPR çiplerinin hazırlanmasından sonra ilk yapılan aflatoxin tayini sonrası 3, 6, 12 ve 18 ay olarak planlanmıştır. AFB1 ve AFM1 baskılanmış nanosensörlerin raf ömrü kararlılığı sırasıyla ve %88 ve %87.92 olarak hesaplanmıştır.

İyi hassasiyet ve tekrarlanabilirlik ile MIP temelli aflatoxin sensörlerinin gıda örneklerinde AFB1 ve AFM1'i seçici optik tayini için etkili bir yöntem olma potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Moleküler baskılanmış nanofilm kaplı SPR çiplerin kolay tasarlanması ve sağlamlığı, algılama cihazlarının geliştirilmesi için ideal adaylar olmasını sağlamaktadır. Tez kapsamında değerlendirilen sonuçların bu ideal yaklaşıma uyumluluğu kanıtlanmıştır. AFB1 ve AFM1 baskılanmış polimer film temelli SPR nanosensör sisteminin geleneksel analitik yöntemlerle kıyaslandığında uyumlu sonuçlar elde edildiği ve hem AFB1 hem de AFM1 için düşük derişimlerde daha hassas sonuçların elde edilebildiği gösterilmiştir. Gıda numunelerinde AFB1 ve AFM1 tayini önerilen altın nanopartikül gömülü moleküler baskılanmış polimer film temelli duyarlılığı artırılmış SPR nanosensörünün kabul edilebilir doğruluğunu göstermektedir. Bu analizler, gerçek tarım ürünlerinde AFB1 ve süt ürünlerinde AFM1 tayini için tasarlanan biyoalgılama sisteminin uygulanabileceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas, H. K., Cartwright, R. D., Xie, W., & Shier, W. T. *Crop Protection*, 25 (2006) 1-9.
- Adányi, N., Levkovets, I. A., Rodriguez-Gil, S., Ronald, A., Váradi, M., & Szendro, I., *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6) (2007) 797–802.
- Ahmad, R., Griffete, N., Lamouri, A., Felidj, N., Chehimi, M. M., & Mangeney, C. *Chemistry of Materials*, 27(16) (2015) 5464-5478.
- Akgönüllü, S., Yavuz, H., & Denizli, A., *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(4) (2017) 800-807.
- Akgönüllü, Semra, Battal, D., Yalcin, M. S., Yavuz, H., & Denizli, A., *Microchemical Journal*, (2020) 104454.
- Alshannaq, A., & Yu, J. H., *International Journal of Environmental Research and Public*, 14(6) (2017) 632.
- Altintas, Z., *Scientific Reports*, 8 (2018) 11222.
- Anantha-Iyengar, G., Shanmugasundaram, K., Nallal, M., Lee, K. P., Whitcombe, M. J., Lakshmi, D., & Sai-Anand, G., *Progress in Polymer Science*, 88 (2019) 1–129.
- Antonissen, G., Martel, A., Pasmans, F., Ducatelle, R., Verbrugghe, E., Vandenbroucke, V., Li, S., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., Croubels, S., *Toxins*, 6(2) (2014) 430-452.
- Anukul, N., Vangnai, K., & Mahakarnchandkul, W., *Journal of Food and Drug Analysis*, 21(3) (2013) 227-241.
- Arévalo, F. J., Granero, A. M., Fernández, H., Raba, J., & Zón, M. A., *Talanta*, 83(3) (2011) 966-973.
- Arias, M. M. D., Leandro, L. F., & Munkvold, G. P., *Phytopathology*, 103(8) (2013) 822-832.
- Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R., & Holley, R. A., *Journal of Stored Products Research*, 41(5) (2005) 513-527.
- Ayankojo, A. G., Reut, J., Öpik, A., Furchner, A., & Syritski, V., *Biosensors and Bioelectronics*, 118 (2018) 102-107.

- Ayawei, N., Ebelegi, A. N., & Wankasi, D., *Journal of Chemistry*, (2017) 3039817.
- Baker, S. E., & Bennett, J. W. In *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, Gustavo H. Goldman, Stephen A. Osmani Eds., Vol 1. *CRC Press, Boca Raton, Chapter 1, 2007*.
- Battal, D., Akgönüllü, S., Yalcin, M. S., Yavuz, H., & Denizli, A., *Biosensors and Bioelectronics*, 111 (2018) 10-17.
- Běláková, S., Benešová, K., Čáslavský, J., Svoboda, Z., & Mikulíková, R., *Food Control*, 33 (2014) 93-98.
- Belbruno, J. J., *Chemical Reviews*, 119(1) (2019) 94-119.
- Benkerroum, N., *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16 (2019) 3633.
- Bennett, J. W., & Klich, M., *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3) (2003) 497-516.
- Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G., & Vlegaar, R., *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 11 (1988) 743-745.
- Bhat, R. V., Ramakrishna, Y., Beedu, S. R., & Munshi, K. L., *The Lancet*, 1(8628) (1989) 35-37.
- Bhattacharya, R. K., Francis, A. R., & Shetty, T. K., *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 188 (1987) 121-128.
- Bilandžić, N., Božić, D. D., Dokić, M., Sedak, M., Kolanović, B. S., Varenina, I., Tankovic, S., Cvetnić, Ž., *Food Control*, 40 (2014) 260-264.
- Blount, W. P., *Turkeys*. 9(7) (1961) 52-61.
- Bognanno, M., Fauci, L. La, Ritieni, A., Tafuri, A., De Lorenzo, A., Micari, P., ... Galvano, F., *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(3) (2006) 300-305.
- Boonen, J., Malysheva, S. V., Taevernier, L., Diana Di Mavungu, J., De Saeger, S., & De Spiegeleer, B., *Toxicology*, 301(1-3) (2012) 21-32.
- Bottalico, A., & Perrone, G., *European Journal of Plant Pathology*, 108 (2002) 611-624.
- Butt, H. J., Cappella, B., & Kappl, M., *Surface Science Reports*, 59 (2005) 1-152.

- Castillo, G., Spinella, K., Poturnayová, A., Šnejdárková, M., Mosiello, L., & Hianik, T., *Food Control*, 52(165) (2015) 9-18.
- Cendoya, E., Monge, M. P., Palacios, S. A., Chiacchiera, S. M., Torres, A. M., Farnochi, M. C., & Ramirez, M. L., *Food Control*, 37 (2014) 56-61.
- Chang, K. F., Hwang, S. F., Conner, R. L., Ahmed, H. U., Zhou, Q., Turnbull, G. D., Strelkov, S. E., McLaren, D. L., Gossen, B. D., *Crop Protection*, 67 (2015) 52-58.
- Chen, Z. Y., Rajasekaran, K., Brown, R. L., Sayler, R. J., & Bhatnagar, D., *World Mycotoxin Journal*, 8(2) (2015) 211-224.
- Chu, F. S., & Li, G. Y., *Applied and Environmental Microbiology* 60(3) (1994) 847–852.
- Cohen, R., Orgil, G., Burger, Y., Saar, U., Elkabetz, M., Tadmor, Y., Edelstein, M., Belausov, E., Maymon, M., Freeman, S., Yarden, O., *Plant Pathology*, 64(3) (2015) 655-663.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Nester, M. A., Efraim, P., & Taniwaki, M. H., *Food Chemistry*, 136 (2013) 100-104.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Fungaro, M. H., & Taniwaki, M. H., *International Journal of Food Microbiology*, 148 (2011) 141-144.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., & Taniwaki, M. H., *Control*, 26 (2012) 36-41.
- Cordeiro, F., Baer, I., Robouch, P., Emteborg, H., Can, S. Z., Krata, A., Zampella, M., Quetel, C. R., Hearn, R., De la Calle, B., *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 30(4) (2013) 678-686.
- Cortinovis, C., Battini, M., & Caloni, F., *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(2) (2012) 72-74.
- Creppy, E. E., *Toxicology Letters*, 127(1-3) (2002) 19-28.
- Cvetnić, Z., & Pepeljnjak, S., *Atmospheric Environment*, 31(3) (1997) 491-495.
- Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J., *Essays in Biochemistry*, 60(1) (2016) 91-100.

- Daniel, M. C., & Astruc, D., *Chemical Reviews*, 104(1) (2004) 293-346.
- De Felice, D. V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., & Castoria, R., *Phytopathology*, 98(12) (2008) 1261-1270.
- Dennis, R. W. G., & Booth, C., *Kew Bulletin*, 27(2) (1972) 371-372.
- Diltemiz, S. E., & Ecevit, K., *Journal of Alloys and Compounds*, 783 (2019) 608–616.
- Dong, J., Gao, N., Peng, Y., Guo, C., Lv, Z., Wang, Y., Zhou C., Ning B., Liu, M., Gao, Z., *Food Control*, 25(2) (2012) 543-549.
- Edupuganti, S. R., Edupuganti, O. P., Hearty, S., & O’Kennedy, R., *Talanta*, 115 (2013) 329-335.
- Elahi, N., Kamali, M., & Baghersad, M. H., *Talanta*, 184 (2018) 537-556.
- Esentürk, M. K., Akgönüllü, S., Yılmaz, F., & Denizli, A., *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(8) (2019) 646-661.
- Ezekiel, C. N., Atehnkeng, J., Odebode, A. C., & Bandyopadhyay, R., *International Journal of Food Microbiology*, 189 (2014) 18-25.
- Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., & Sun, Y., *Analytica Chimica Acta*, 64(1-2) (2008) 8-26.
- Fodey, T., Leonard, P., O’Mahony, J., O’Kennedy, R., & Danaher, M., *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(2) (2011) 254-269.
- Girgin, G., Başaran, N., Şahin, G., *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 58(3) (2001) 97–118.
- Gale, L. R., Harrison, S. A., Ward, T. J., O’Donnell, K., Milus, E. A., Gale, S. W., & Kistler, H. C., *Phytopathology*, 101(1) (2011) 124-134.
- Gerez, J. R., Pinton, P., Callu, P., Grosjean, F., Oswald, I. P., & Bracarense, A. P. F. L. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(2) (2015) 89-98.
- Goldblatt, L., Aflatoxin. Scientific Background, Control and Implications, Food and Cosmetics Toxicology. Chapet 1, Elsevier, USA, 2012.
- Golinski, P., Vesonder, R. F., Latus-Zietkiewicz, D., & Perkowski, J., *Applied and Environmental Microbiology*, (1988) 2147-2148.
- Goryacheva, I. Y., De Saeger, S., Delmulle, B., Lobeau, M., Eremin, S. A., Barna-

- Vetró, I., & Van Peteghem, C., *Analytica Chimica Acta*, 590(1) (2007) 118–124.
- Goyal, G., Bhakta, S., & Mishra, P., *ACS Applied Nano Materials*, 2(10) (2019) 6747–6756.
- Gu, Y., Wang, Y., Wu, X., Pan, M., Hu, N., Wang, J., & Wang, S., *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 291 (2019) 293–297.
- Guo, L., Feng, J., Fang, Z., Xu, J., & Lu, X., *Trends in Food Science and Technology*, 46(2A) (2015) 252–263.
- Guo, P., Yang, W., Hu, H., Wang, Y., & Li, P., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 (2019) 2607–2617.
- Guo, X., *Journal of Biophotonics*, 5(7) (2012) 483–501.
- Gurban, A. M., Epure, P., Oancea, F., & Doni, M., *Sensors*, 17(12) (2017) 2951.
- Gutierrez, A. V. R., Hedström, M., & Mattiasson, B., *Biotechnology Reports*, 11 (2016) 12–17.
- Hamed, A. M., Moreno-González, D., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. *Food Analytical Methods*, 10 (2017) 516–521.
- Hannachi, I., Poli, A., Rezgui, S., Prasad, R. D., & Cherif, M., *European Journal of Plant Pathology*, 142 (2015) 269–280.
- Hartley, R.D., Nesbitt, B.F., O’Kelly, J., *Nature*, 198 (1963) 1056–1058.
- Heilmann, W., Rehfeldt, A. G., & Rotzoll, F., *European Food Research and Technology*, 209 (1999) 297–300.
- Holzinger, M., Goff, A. Le, & Cosnier, S., *Frontiers in Chemistry*, 2 (2014).
- Homola, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical Reviews*, 108(2) (2008) 462–493.
- Homola, J., Dostálek, J., Chen, S., Rasooly, A., Jiang, S., & Yee, S. S., *International Journal of Food Microbiology*, 75(1-2) (2002) 61–69.
- Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Menezes, H. C., Vicente, E., & Fungaro, M. H. P., *Food Additives and Contaminants*, 22(12) (2005) 1258–1263
- Iavicoli, I., Brera, C., Carelli, G., Caputi, R., Marinaccio, A., & Miraglia, M., *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 75 (2002) 381–

386.

International Agency for Research on Cancer (IARC), **1993**. IARC Monograph Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans No. 56.

Iqbal, S. Z., Asi, M. R., Jinap, S., & Rashid, U., *Food Control*, 35(1) (**2014**) 223-226.

Janaína, S. B., Ariane, M. K., Emerson, S. L., Pedro, H. C. F., Cibele, de S. V., Lawrence, R. X., Pinto, S. de C. B., Augusto, K. K., *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 13(13) (**2019**) 163–169.

Jiang, M., Braiek, M., Florea, A., Chrouda, A., Farre, C., Bonhomme, A., Bessueille, F., Vocanson, F., Zhang, A., Jaffrezic-Renault, N., *Toxins*, 7(9) (**2015**) 3540–3553.

Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J. C., Idrissi, L., & Mañes, J., *Food Control*, 19(9) (**2008**) 849-853.

Kange, A. M., Cheruiyot, E. K., Ogendo, J. O., & Arama, P. F., *Agriculture and Food Security*, 4(15) (**2015**).

Kaur, H., Mohan, C., Vikal, Y., & Singh, M., *Maydica*, 59(3) (**2014**) 290-297

Kaushik, S., Tiwari, U. K., Deep, A., & Sinha, R. K., *Scientific Reports*, 9 (**2019**).

Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N., & Groopman, J. D., *Toxicological Sciences*, 120 (**2011**) 28-48.

Khalil, M. M. H., Gomaa, A. M., & Sebaei, A. S., *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013 (**2013**) 1-5.

Khansili, N., Rattu, G., & Krishna, P. M., *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 265 (**2018**) 35–49.

Khlangwiset, P., Shephard, G. S., & Wu, F., *Critical Reviews in Toxicology*. 41(9) (**2011**) 740-755.

Kiecana, I., Cegiełko, M., Mielniczuk, E., & Perkowski, J., *Acta Agrobotanica*, 65(4) (**2012**) 169-178

Kirk, G. D., Bah, E., & Montesano, R., *Carcinogenesis*, 27(10) (**2006**) 2070–2082.

Kosmidis, C., & Denning, D. W., *Thorax*, 70 (**2015**) 270-277.

Koyun, S., Akgönüllü, S., Yavuz, H., Erdem, A., & Denizli, A., *Talanta*, 194 (**2019**) 528-533.

- Krishnamoorthy, G., Carlen, E. T., Van Den Berg, A., & Schasfoort, R. B. M., *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 148(2) (2010) 511-521.
- Kundu, S., Gupta A.K., *Chemical Engineering Journal*, 122 (2006) 93–106.
- Kwok, D. Y., & Neumann, A. W., *Advances in Colloid and Interface Science*, 81(3) (1999) 167-249.
- Lee, H. J., & Ryu, D., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (2017) 7034-7051.
- Li, C., Selvaraj, J. N., FuGuo, X., YueJu, Z., Lu, Z., & Yang, L., *Food Control* 30(2) (2013) 469-473.
- Li, Y., Schluesener, H. J., & Xu, S., *Gold Bulletin*, 43 (2010) 29–41.
- Liang, G., Zhai, H., Huang, L., Tan, X., Zhou, Q., Yu, X., & Lin, H., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 149 (2018) 258–264.
- Lindblad, M., Gidlund, A., Sulyok, M., Börjesson, T., Krska, R., Olsen, M., & Fredlund, E., *International Journal of Food Microbiology*, 167(2) (2013) 284-291.
- Liu, B., Liu, X., Shi, S., Huang, R., Su, R., Qi, W., & He, Z., *Acta Biomaterialia*. 40 (2016) 100-118.
- Lucchetta, G., Bazzo, I., Cortivo, G. D., Stringher, L., Bellotto, D., Borgo, M., & Angelini, E., *Toxins*, 2(4) (2010) 840-855.
- Lysøe, E., Klemsdal, S. S., Bone, K. R., Frandsen, R. J. N., Johansen, T., Thrane, U., & Giese, H., *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6) (2006) 3924-3932.
- Ma, H., Sun, J., Zhang, Y., & Xia, S., *Biochemical Engineering Journal*, 115 (2016) 38–46.
- Ma, L. J., Shea, T., Young, S., Zeng, Q., & Corby Kistler, H., *Genome Announcements*, 2(4) (2014) e00730-14.
- Macholz, R., *Food / Nahrung. Molecular Nutrition Food Research*, 32(2) (1988) 150-150.
- Mahnine, N., Meca, G., Fernández-Franzón, M., Mañes, J., & Zinedine, A., *Phytopathologia Mediterranea*, 51 (2012)193-197
- Malekzad, H., Sahandi Zangabad, P., Mohammadi, H., Sadroddini, M., Jafari, Z.,

- Mahlooji, N., ... Hamblin, M. R., *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 100 (2018) 116-135.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., & Novotna, E., *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 98(6) (2013) 493-502.
- Maresca, M., Mahfoud, R., Garmy, N., & Fantini, J., *The Journal of Nutrition*, 132(9) (2002) 2723-2731.
- Marimón Sibaja, K. V., Gonçalves, K. D. M., Garcia, S. D. O., Feltrin, A. C. P., Nogueira, W. V., Badiale-Furlong, E., & Garda-Buffon, J., *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 12(2) (2019) 97-104.
- Marin, D. E., Pistol, G. C., Neagoe, I. V., Calin, L., & Taranu, I., *Food and Chemical Toxicology*, 58 (2013) 408-415.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V., *Food and Chemical Toxicology*, 60 (2013) 218-237.
- Miličević, D. R., Škrinjar, M., & Baltić, T., *Toxins*, 2(4) (2010) 572-592.
- Miller, J. D., *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25(2) (2008) 219-230
- Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., & Pfohl-Leszkowicz, A., *Food Chemistry*, 92(3) (2005) 391-400.
- Moreno-Bondi, M., Navarro-Villoslada, F., Benito-Pena, E., & Urraca, J., *Current Analytical Chemistry*, 4(4) (2008) 316-340.
- Moretti, A., Logrieco, A. F., & Susca, A., Mycotoxigenic Fungi. In: Moretti A., Susca A. (eds), *Methods in Molecular Biology*, vol 1542. Humana Press, New York, NY 2017.
- Moss, M. O., *Journal of Applied Bacteriology*, 73 (1992) 80-88.
- Mousavi Khaneghah, A., Fakhri, Y., Gahrue, H. H., Niakousari, M., & Sant'Ana, A. S., *Trends in Food Science and Technology*, 91 (2019) 95-105.
- Nguyen, P. A., Strub, C., Fontana, A., & Schorr-Galindo, S., *Biological Control*, 104 (2017) 10-27.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., & Samson, R. A., *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure*

- and Risk Assessment*, 26(1) (2009) 94-100.
- Oliveira, P. M., Mauch, A., Jacob, F., Waters, D. M., & Arendt, E. K., *International Journal of Food Microbiology*, 156(1) (2012) 32-43.
- Oyetunji, T. O., *African Journal of Biotechnology*, 5(22) (2006) 2073-2076.
- Park, J. H., Kim, Y. P., Kim, I. H., & Ko, S., *Food Control*, 36(1) (2014) 183-190.
- Pavlou, G. C., & Vakalounakis, D. J., *Crop Protection*, 24(2) (2005) 135-140.
- Peltomaa, R., Glahn-Martínez, B., Benito-Peña, E., & Moreno-Bondi, M. C., *Sensors*, 18(12) (2018) 4126.
- Peng, D., Yang, B., Pan, Y., Wang, Y., Chen, D., Liu, Z., ... Yuan, Z., *Toxicon*, 113 (2016) 18-24.
- Pennacchio, A., Ruggiero, G., Staiano, M., Piccialli, G., Oliviero, G., Lewkowicz, A., Saynak, A., Bojarski, P., D'Auria, S., *Optical Materials*, 36(10) (2014) 1670-1675.
- Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P., & Lebrihi, A., *Journal of Applied Microbiology*, 104(5) (2008) 1495-1502.
- Pietsch, C., Kersten, S., Valenta, H., Dänicke, S., Schulz, C., Burkhardt-Holm, P., & Junge, R., *Toxins*, 7(9) (2015) 3465-3480.
- Piletska, E., Karim, K., Coker, R., & Piletsky, S., *Journal of Chromatography A*, 1217(16) (2010) 2543-2547.
- Pitt, J. I., *British Medical Bulletin*, 56(1) (2000) 184-192.
- Pitt, J. I., Basílico, J. C., Abarca, M. L., & López, C., *Medical Mycology*, 38 (2000) 41-46.
- Ploetz, R. C., *Phytopathology*, 96 (2006) 653-656.
- Polan, C. E., Hayes, J. R., & Campbell, T. C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22 (1974) 635-638.
- Qi, X., Yu, T., Zhu, L., Gao, J., He, X., Huang, K., Luo, Y., Xu, W., Xu, W., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(3) (2014) 543-549.
- Qiu, J., & Wei, W. D., *Journal of Physical Chemistry C*, 118 (2014) 20735-20749.
- Qiu, M., Zhang, R., Xue, C., Zhang, S., Li, S., Zhang, N., & Shen, Q., *Biology and*

- Fertility of Soils*, 48 (2012) 807–816.
- Rastogi, S., Dwivedi, P. D., Khanna, S. K., & Das, M., *Food Control*, 15(4) (2004) 287-290.
- Ren, Z., Wang, Y., Deng, H., Deng, Y., Deng, J., Zuo, Z., ... Shen, L. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1) (2015) 339–346.
- Resnick, A., *Journal Contemporary Physics*, 54 (2013) 169.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., & Vismer, H. F., *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5) (2002) 2101-2105.
- Rhouati, A., Catanante, G., Nunes, G., Hayat, A., & Marty, J. L., *Sensors*, 16(12) (2016) 2178.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., & Córdoba, J. J., *Meat Science*, 92(4) (2012) 728-734.
- Romani, S., Sacchetti, G., Lopez, C. C., Pinnavaia, G. G., & Rosa, M. D., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8) (2000) 3616-3619.
- Romero, S. M., Comerio, R. M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G., & Fernández Pinto, V., *International Journal of Food Microbiology*, 104(1) (2005) 43-49.
- Ruadrew, S., Craft, J., & Aidoo, K., *Food and Chemical Toxicology*, 55 (2013) 653-658.
- Sabet, F. S., Hosseini, M., Khabbaz, H., Dadmehr, M., & Ganjali, M. R., *Food Chemistry*, 220 (2017) 527–532.
- Sánchez-Hervás, M., Gil, J. V., Bisbal, F., Ramón, D., & Martínez-Culebras, P. V., *International Journal of Food Microbiology*, 125(3) (2008) 336-340.
- Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, J. H., Dano, D. S., Betbeder, A. M., Achour, A., & Creppy, E. E., *Toxicon*, 47(8) (2006) 894-900.
- Saylan, Y., Akgönüllü, S., Çimen, D., Derazshamshir, A., Bereli, N., Yılmaz, F., & Denizli, A., *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 241 (2017) 446-454.
- Saylan, Y., Akgönüllü, S., Yavuz, H., Ünal, S., Denizli, A., *Sensors*, 19(6) (2019) 1279.
- Scaglioni, P. T., Becker-Algeri, T., Drunkler, D., & Badiale-Furlong, E., *Analytica Chimica Acta*, 829 (2014) 68–74.

- Schasfoort, R. B. M. In *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, Richard B. M. Schasfoort Ed., Chapter 1, The Royal Society of Chemistry, **2017**.
- Sener, G., Uzun, L., & Denizli, A., *Analytical Chemistry*, 86(1) (**2014**) 514–520.
- Sepúlveda, B., Angelomé, P. C., Lechuga, L. M., & Liz-Marzán, L. M., *Nano Today*, 4(3) (**2009**) 244-251.
- Sergeyeva, T., Yarynka, D., Piletska, E., Linnik, R., Zaporozhets, O., Brovko, O., ... El'skaya, A., *Talanta*, 201 (**2019**) 204–210.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., & Venâncio, A., *International Journal of Food Microbiology*, 88(1) (2003) 63-68.
- Shadjou, R., Hasanzadeh, M., Heidar-poor, M., & Shadjou, N., *Journal of Molecular Recognition*, 31(6) (2018)1–9.
- Shank, R. C., Gordon, J. E., Wogan, G. N., Nondasuta, A., & Subhamani, B. *Food and Cosmetics Toxicology*, 10(1) (**1972**) 71-84.
- Shank, R. C., Wogan, G. N., & Gibson, J. B., *Food and Cosmetics Toxicology*, 10(1) (**1972**) 51-60.
- Shankaran, D. R., Gobi, K. V., & Miura, N. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 121(1) (**2007**) 158-177.
- Sharma, A., Catanante, G., Hayat, A., Istamboulie, G., Ben, I., Bhand, S., & Louis, J., *Talanta*, 158 (**2016**) 35–41.
- Shim, W.B., Mun, H., Joung, H.A., Ofori, J.A., Chung, D.H., Kim, M.N., *Food Control* 36(1) (**2014**) 30-35.
- Sreenivasa, M., Tukaram, D., Charith, R., Dass, R., Naidu, A., & Janardhana, G., *Annals: Food Science and Technology*, 4(1) (**2013**) 100-107.
- Stanković, S., Lević, J., Ivanović, D., Krnjaja, V., Stanković, G., & Tančić, S., *Food Control*, 23(2) (**2012**) 384-388.
- Stoloff, L., Aflatoxin as a Cause of Primary Liver-Cell Cancer in the United States: A Probability Study. *Nutrition and Cancer*, 5 (**1983**) 165-186.
- Subramanian, P., Lesniewski, A., Kaminska, I., Vlandas, A., Vasilescu, A., Niedziolka-Jonsson, J., Pichonat E., Happy H., Boukherroub R., Szunerits, S., *Biosensors and*

- Bioelectronics*, 50 (2013) 239-243.
- Sun, L. H., Lei, M. Y., Zhang, N. Y., Gao, X., Li, C., Krumm, C. S., & Qi, D. S., *Toxicon*, 95 (2015) 6-12.
- Sun, Y., & Xia, Y., Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, 298(5601) (2002) 2176-2179.
- Szigeti, G., Kocsubé, S., Dóczy, I., Bereczki, L., Vágvölgyi, C., & Varga, J., *Mycopathologia*, 174 (2012) 143-147.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., & Iamanaka, B. T., *International Journal of Food Microbiology*, 82(2) (2003) 173-179.
- Tittlemier, S. A., Roscoe, M., Trelka, R., Gaba, D., Chan, J. M., Patrick, S. K., Sulyok, M., Krska, R., McKendry, T., Gräfenhan, T., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23) (2013) 5438-5448.
- Turner, N. W., Bramhmbhatt, H., Szabo-Vezse, M., Poma, A., Coker, R., & Piletsky, S. A., *Analytica Chimica Acta*, 901 (2015) 12-33.
- Vaz, A., Silva, A. C. C., Rodrigues, P., & Venâncio, A., *Microorganisms*, 8 (2020) 246.
- Vidal, A., Marín, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V., *Food and Chemical Toxicology*, 53 (2013) 133-138.
- Vidal, A., Mengelers, M., Yang, S., De Saeger, S., & De Boevre, M., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5) (2018) 1127-1155.
- Vitale, A., Cirvilleri, G., Panebianco, A., Epifani, F., Perrone, G., & Polizzi, G., *European Journal of Plant Pathology*, 132 (2012) 483-487.
- Von Braun, J., The World Food Situation New Driving Forces and Required Actions, International Food Policy Research Institute (IFPRI) 2007.
- Wanekaya, A. K., Chen, W., & Mulchandani, A., *Journal of Environmental Monitoring*, 10 (2008) 703-712.
- Wang, X., Niessner, R., Tang, D., & Knopp, D., *Analytica Chimica Acta*, 912 (2016) 10-23.
- Wang, Z., Li, J., Xu, L., Feng, Y., & Lu, X., *Journal of Solid State Electrochemistry*, 18 (2014) 2487-2496.

- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D., *American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (2004) 1106–1122.
- Wogan, G. N., & Newberne, P. M., *Cancer Research*, 31 (1971) 1936-1942.
- Xue, Z., Zhang, Y., Yu, W., Zhang, J., Wang, J., Wan, F., Kim, Y., Liu, Y., Kou, X., *Analytica Chimica Acta*, 1069 (2019) 1-27.
- Yang, X., Lv, Y., Huang, K., Luo, Y., & Xu, W., *Food and Chemical Toxicology*, 92 (2016) 17-25.
- Yao, T., Gu, X., Li, T., Li, J., Li, J., Zhao, Z., Wang, J., Quin, Y., She, Y., *Biosensors and Bioelectronics*, 75 (2016) 96-100.
- Yin, D., Li, X., Ma, Y., & Liu, Z., *Chemical Communications*, 53 (2017) 6716-6719.
- Yılmaz, E., Ozgur, E., Bereli, N., Turkmen, D., & Denizli, A., *Materials Science and Engineering C*, 73 (2017) 603-610.
- Yılmaz, F., Saylan, Y., Akgönüllü, S., Çimen, D., Derazshamshir, A., Bereli, N., & Denizli, A., In *New Pesticides and Soil Sensors*, A. Mihai Grumezescu Ed., Chapter 18, Elsevier, 2017.
- Yuan, Y., & Lee, T. R., In: Bracco G., Holst B. (eds) *Surface Science Techniques*. Springer Series in Surface Sciences, vol 51. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013.
- Zain, M. E., *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2) (2011) 129-144.
- Zhang, G., Li, J., Lv, J., Liu, L., Li, C., & Liu, L., *Journal of Food Safety*, 39(5) (2019) e12673.
- Zhang, H., Zhang, Z., Van Der Lee, T., Chen, W. Q., Xu, J., Xu, J. S., ... Feng, J. *Phytopathology*, 100 (2010) 328-336.
- Zhang, L., Zhu, C., Chen, C., Zhu, S., Zhou, J., Wang, M., & Shang, P., *Food Chemistry*, 266 (2018) 170–174.
- Zhang, X., Feng, M., Liu, L., Xing, C., Kuang, H., Peng, C., Wang, L., Xu, C., *International Journal of Food Science and Technology*, 48 (2013) 1269-1274.
- Zheng, N., Sun, P., Wang, J. Q., Zhen, Y. P., Han, R. W., & Xu, X. M., *Food Control*, 29(1) (2013) 198-201.
- Zhou, X. C., O'Shea, S. J., & Li, S. F. Y., *Chemical Communications*, (2000) 953-954

Zhou, Y., Xiong, S., Zhang, K. K., Feng, L., Chen, X., Wu, Y., Huang, X., Xiong, Y.,
Journal of Dairy Science. 102(5) (2019) 3985–3993

Zinedine, A., Soriano, J. M., Juan, C., Mojemmi, B., Moltó, J. C., Bouklouze, A., ...
Mañes, J., *Food Additives and Contaminants*, 24 (2007) 285-291.

EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

Akgönüllü S., Yavuz H., Denizli A., “Aflatoksin tayini için yüzey plazmon rezonans sensörlerin hazırlanması”, 15-17 Haziran 2017 11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, Kuşadası, Türkiye (SÖZLÜ)

Akgönüllü S., Yavuz H. & Denizli A., Detection of aflatoxin B1 using a molecularly imprinted polymer-coated optic sensor. 28-30 August 2019. 8th Graduate Student Symposium on Molecular Imprinting, Berlin, Germany. (ORAL PRESENTATION)

Akgönüllü S., Yavuz H., Denizli A., Surface Plasmon Resonance-Based Sensors for Detection of Aflatoxin, Polymers 2018: Design, Function and Application, 21-23 March 2018, Barcelona, Spain (POSTER).