

Sütte Laktoz Tayini İçin Biyosensörlerin Kullanımı

Sadık Çoğal¹, Songül Şen Gürsoy², Gamze Çelik Çoğal³, Oğuz Gürsoy⁴ ✉

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Polimer Mühendisliği Bölümü, Burdur

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Burdur

³Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Teknolojileri Mühendisliği Anabilim Dalı, Burdur

⁴Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur

Geliş Tarihi (Received): 01.12.2015, Kabul Tarihi (Accepted): 18.02.2016

✉ *Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): ogursoy@yahoo.com (O. Gürsoy)*

☎ 0 248 213 27 23 📠 0 248 213 27 04

ÖZ

Sütün laktoz içeriği, süt kalitesinin değerlendirilmesinde temel bir indikatördür. Sütte laktoz tayini için kullanılan yöntemlerin önemli bir bölümü zaman alıcı, nitelikli iş gücü gerektiren ve pahalı yöntemlerdir. Laktoz tayininde biyosensörlerin kullanımı ucuz, kolay ve hızlı bir alternatif olarak görülmektedir. Günümüze kadar farklı tiplerde laktoz biyosensörleri geliştirilmiştir. Bunlar, daha çok farklı enzimlerin immobilize edildiği, amperometrik ve iletkenlik ölçümlerine dayalı sensörlerdir. Bu çalışmada biyosensörlerin yapısı ve özellikleri ile ilgili bilgiler verildikten sonra farklı immobilizasyon metod ve materyalleri kullanılarak laktoz tayini için geliştirilen farklı enzim biyosensörleri ile ilgili çalışmalar derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Süt, Laktoz, Biyosensör, Enzim, İmmobilizasyon

Use of Biosensors for Determination of Lactose in Milk

ABSTRACT

Lactose content of milk is a basic indicator for the evaluation of milk quality. Various methods are used for the determination of lactose; however, many of these methods are generally time-consuming, labor-intensive and expensive for routine quality control applications. Biosensors offer a cheap, quick, and reliable alternative for lactose determination. Until today many different types of biosensors have been developed. These biosensors are mostly enzyme sensors, which are developed by the immobilization of different enzymes, based on amperometric and conductivity measurements. In this present study, the structure and properties of biosensors are presented, and studies on different enzyme biosensors developed for the determination of lactose using different immobilization methods and materials are reviewed.

Keywords: Milk, Lactose, Biosensor, Enzyme, Immobilization

GİRİŞ

Sütün laktoz içeriği, süt kalitesinin değerlendirilmesinde ve sütün mastitisli hayvanlardan elde edilip edilmediğinin (düşük laktoz içerikli) belirlenmesinde temel bir

indikatördür. Bu nedenle laktoz miktarının belirlenmesi süt ve süt ürünleri endüstrisinde proses ve ürünlerin kontrolü için rutin olarak yapılmaktadır. Yine sütteki laktoz miktarının belirlenmesi laktoz intoleransından kaynaklanan rahatsızlıkların önlenmesi açısından da önemli görülmektedir. Sütte laktoz tayini için kullanılan

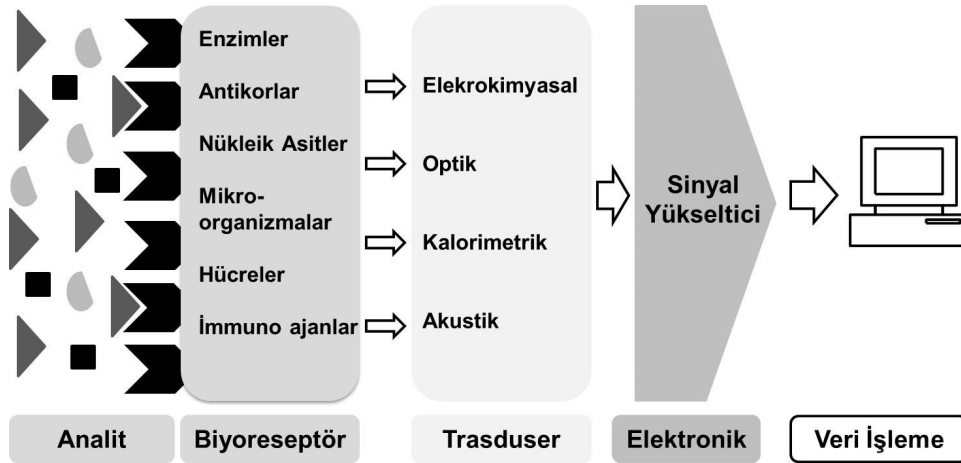
yöntemlerin (polarimetrik, spektrofotometrik, kromatografik vb.) önemli bir bölümü zaman alıcı, nitelikli iş gücü gerektiren ve pahalı yöntemlerdir. Laktoz tayininde biyosensörlerin kullanımı ucuz, kolay ve hızlı bir alternatif olarak görülmektedir.

Bir biyosensör biyolojik bir algılayıcı (biyoreseptör) ile elde edilen sinyali elektrik sinyaline dönüştürebilen transduser içeren analitik cihazdır. Bu sistemde sinyal hedef analit ile biyotanıma molekülünün (enzim, antikor vb.) reaksiyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. Biyosensörler ile hedef analite son derece spesifik ve yüksek hassasiyette ölçümler yapılabilmektedir [1]. Diğer ölçüm sistemleri ile karşılaştırıldığında kullanımları kolay olan, hızlı ve ekonomik analiz olanağı sağlayan biyosensörler ile ilgili yapılan çalışmalarda önemli bir artış görülmektedir. Web of Science veri tabanında biyosensör anahtar kelimesi ile makale başlığı taraması yapıldığında son on yılda (2005-2015) yayınlanmış 9500'ün üzerinde ve biyosensör anahtar kelimesi ile konu taraması yapıldığında 32000'in üzerinde çalışmaya rastlanmaktadır.

Bu çalışmada, biyosensörlerin yapısı ve özellikleri ile ilgili bilgiler verildikten sonra farklı immobilizasyon yöntemleri (adsorbsiyon, tutuklama, kovalent bağlama ve çapraz bağlama) ve materyalleri kullanılarak laktoz tayini için geliştirilen farklı enzim biyosensörleri ile ilgili çalışmalar derlenmiştir.

BİYOSENSÖRÜN YAPISI

Biyosensörler en basit şekilde biyolojik-biyokimyasal sinyalleri veya cevabı ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürebilen biyoanalitik düzenekler olarak tanımlanmaktadır [2]. Biyosensörler genellikle birbirleriyle seri bağlı olan kimyasal (moleküler) bir tanıma sistemi (reseptör) ile fizikokimyasal bir dönüştürücü (transduser) olmak üzere iki temel bileşen içermektedirler [3, 4] (Şekil 1). Biyokimyasal bir mekanizmayı tanıma sistemi olarak kullanan biyosensörler kimyasal sensörlerdir [3].



Şekil 1. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi ([5-7]'den uyarlanmıştır)

İçerdikleri reseptör tipine göre enzimatik biyosensörler, genosensörler, immunosensörler vb. şekillerde sınıflandırılan biyosensörler, biyokimyasal sinyalin aktarım işlemine (transdüksiyon) göre de; elektrokimyasal, optik, akustik ve termal/kalorimetrik sensörler gibi alt gruplar şeklinde sınıflandırılabilirler [8].

Biyosensörler basit kullanım özellikleri, yüksek duyarlılık ve gerçek zamanlı ölçümlere uygulanma potansiyelleri nedeniyle tıbbi teşhis, çevresel izleme, genetik, savunma sanayi ve gıda işleme endüstrisi gibi alanlarda geniş uygulama alanlarına sahiptir [9]. Gıda endüstrisinde pekmez, patates, süt, peynir, peyniraltı suyu, bira ve şarap gibi gıdalarda glukoz, laktoz, etanol, nişasta, askorbik asit ve malik asit gibi bazı bileşenlerin tespiti amacıyla kullanılan ticari biyosensörler bulunmaktadır [10].

Biyoreseptör

Biyolojik tanıma sistemi biyokimyasal alandan gelen bilgiyi tanımlanır hassasiyet ile kimyasal ya da fiziksel çıkış sinyaline dönüştürmektedir. Tanıma sisteminin başlıca amacı, ölçülecek analit için yüksek seçicilikte bir sensör sağlanmasıdır. Koku ve tat gibi canlı organizmalarda ya da sistemlerde bulunan algılama sistemlerinde gerçek anlamda tanıma sinir iletiminin yanı sıra bir hücre reseptörü tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle reseptör ya da biyoreseptör kelimesi kimyasal bir biyosensörün tanıma sistemi için de sıklıkla kullanılmaktadır [3, 4]. Biyoreseptör olarak kullanılan biyolojik moleküllerin (enzimler, antikorlar, hücreler vb.) birçoğu çözelti fazı içerisinde kısa ömürlüdürler. Bu nedenle bu bileşenlerin uygun bir matriks içerisine yerleştirilmeleri gereklidir [11]. Örneğin enzimlerin aktivitelerini azaltan çevre koşullarına karşı immobilize

edilmeleri ömürlerini uzatmaktadır. Bundan dolayı biyosensörlerin reseptör bileşeni (enzim, çoklu enzim sistemi, antikor, mikroorganizmalar, organel vb.) bir membrana veya jele immobilize edilmektedirler [5]. Immobilize moleküllerin aktiviteleri yüzey alanı, porozite, immobilizasyon matrisinin hidrofilik karakteri, reaksiyon koşulları ve immobilizasyon için seçilen yöntem gibi farklı parametrelere bağlı olarak değişmektedir [11]. Reseptörlerin transduser üzerine immobilizasyonu fiziksel (adsorbsiyon, polimer matrisle tutuklama vb.) veya kimyasal (kovalent bağlanma, çok fonksiyonlu reaktifler ile çapraz bağlanma vb.) yöntemler ile gerçekleştirilebilmektedir. Reseptörlerin immobilizasyonu için kullanılan en yaygın metotlar adsorbsiyon ve kovalent bağlanma iken biyoreseptör olarak en yaygın kullanılan biyolojik bileşenler enzimler ve antikorlardır [12].

Enzimler kimyasal tepkimelere katıldıklarında çok sayıda ölçülebilir reaksiyon ürünü oluşturabildiklerinden (elektron, proton, ısı, ışık vb.) biyoreseptör olarak yaygın kullanılan biyomoleküllerdir [13]. Enzimlerin farklı kaynaklardan izolasyon ve saflaştırılmalarının kolay olması ve ticari olarak elde edilebilmeleri de onların biyosensör araştırmalarında biyolojik tanıma aracı olarak kullanılmalarını popüler hale getirmiştir [14]. Çeşitli oksidoredüktazlar arasında, glukoz oksidaz [15-17], galaktoz oksidaz [18-20], alkali fosfataz [21, 22] ve yaban turpu peroksidadı [23, 24] birçok biyosensör çalışmasında kullanılmıştır.

Enzim temelli biyosensörleri diğer tayin yöntemlerinden ayıran bazı üstün özellikleri vardır. Hedef moleküle spesifik olmaları, enzim temelli biyosensörleri üstün kılan en önemli özelliktir. Çünkü bu tip sensörler, ölçüm ortamındaki renk, bulanıklık ve partiküllerden etkilenmemektedirler [25]. Spesifikliğin yanında ideal bir biyosensör kalibrasyona çok az gereksinim duymaktadır. Ayrıca, yüksek duyarlılığı, düşük tayin sınırları, hızlı cevap süresi, basit ve ucuz olmalarının yanında kolay minyatürize edilebilmeleri [14] açısından da ticari olarak üretime uygun materyallerdir.

Enzimlerin dışında biyoreseptör olarak 1950li yıllardan itibaren kullanılan antikorlar, yüksek duyarlılıkları ve özgüllükleri kanıtlanmış olan moleküllerdir. Antikor tabanlı biyosensörlerin en önemli özellikleri hedefin saptama öncesi saflaştırılmasına ihtiyaç olmamasıdır [13]. Antikorlar dışında oligonükleotitler, mikroorganizmalar ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküller de biyoreseptör olarak kullanılabilirler [5-7, 13].

Transduser

Transduserler biyokimyasal bir sinyali ölçülebilir bir elektrik sinyaline dönüştüren bileşenlerdir. İletici (transducing) mikrosistem, elektrokimyasal, termometrik, optik, akustik veya manyetik olabilmektedir [9]. Biyosensör tasarımında kullanılan bazı transduserlerin sınıflandırılması Tablo 1'de verilmiştir. Elektrokimyasal transduser olarak genellikle potansiyometrik ve amperometrik transduserler kullanılmaktadır. Amperometrik transduserlerde, iki elektrot arasına potansiyel uygulanmakta, elektroaktif türlerin yükseltgenme veya indirgenmesiyle oluşan akım ölçülmekte ve ölçülen akım ilgili analitin konsantrasyonuyla ilişkilendirilmektedir. Potansiyometrik transduserler ise çok düşük akımla elektrokimyasal hücrelerin potansiyelini ölçmektedir. Optik transduserlerde, ucuna enzimlerin ve boyaların ko-immobilize edildiği fiber optik probalar kullanılmaktadır. Bu probalar en az iki fiberden oluşmaktadır. Fiberlerden biri, uyarma dalgasını üreten, belirli bir dalgaboyu aralığındaki bir ışık kaynağına bağlanmaktadır. Diğerisi ise fotodiyota bağlıdır ve uygun dalga boyunda optik yoğunluktaki değişimi tayin etmektedir. Optik transduserlerde kullanılan yüzey plazmon rezonans transduserler algılama bileşeninin yüzeyinde veya yakınındaki kırılma indeksindeki anlık değişimleri ölçerek analitin konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir. Biyosensörlerde kullanılan elektroakustik aygıtlar ise piezoelektrik bir malzeme ile temas halinde bulunan kimyasal açıdan interaktif malzemelerden yapılmış membranların kütle yoğunluğu, elastiklik, viskoelastiklik, elektrik veya dielektrik özelliklerindeki değişimleri tayin etmeye dayanmaktadır.

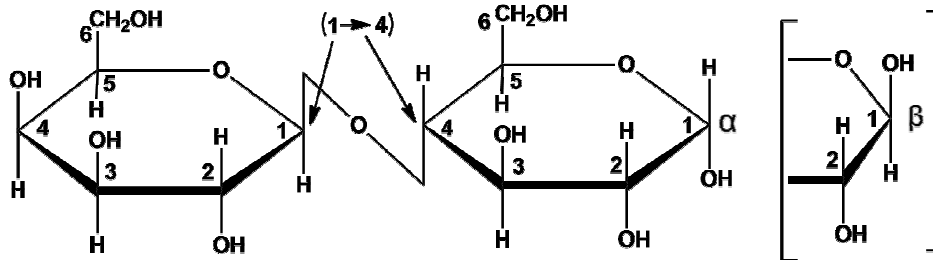
Tablo 1. Biyosensör tasarımında yaygın olarak kullanılan transduserler [26, 27]

Sınıf	Örnekler
Elektrokimyasal	<ul style="list-style-type: none">• Amperometrik• Potansiyometrik• Konduktometrik
Optik	<ul style="list-style-type: none">• Fiber optik• Yüzey plazmon rezonans (SPR)• Fiber optik SPR
Kalorimetrik	<ul style="list-style-type: none">• Isı iletimi• İzotermal• İzoperibol
Akustik	<ul style="list-style-type: none">• Yüzey akustik dalga (SAW)• Piezokristal mikrobals

LAKTOZ ve ÖZELLİKLERİ

Laktöz yapısında β -1,4 glikozidik bağı ile birbirine bağlı D-galaktoz ve D-glukoz içeren bir disakkarittir (Şekil 2). Yapıda galaktözün aldehit grubu glukozun C-4 grubuna bağlı durumdadır. Laktöz'un sistematik ismi " β -O-D-galaktopiranozil-(1-4)- α -D-glukopiranoz" (α -laktöz) veya " β -O-D-galaktopiranozil-(1-4)- β -D-glukopiranoz"dur (β -laktöz) [28]. Laktöz, asit ile kolaylıkla hidroliz edilemez iken "laktaz" (β -D-galaktozidaz) enzimi ile kolaylıkla hidrolize edilebilmektedir. Laktözün enzimatik hidrolizi ile glukoz ve galaktöz meydana gelmektedir. β -galaktozidaz bir galaktopiranoz kalıntısının β -1,4 bağına yüksek derecede spesifiktir. Endüstriyel β -galaktozidazlar laktazların (EC 3.1.2.23) bir alt grubudur. Bütün laktazlar β -galaktozidazlar olarak sınıflandırılabilirken bunun tersi bir sınıflandırma hatalıdır. Zira bitki hücreleri ve memeli organlarındaki (intestinal β -galaktozidazlar hariç) β -galaktozidazlar hücre duvarı polisakaritleri, galaktolipitler ya da glikoproteinlere etki etmekte iken laktöz üzerine çok az aktivite göstermekte veya hiç aktivite göstermemektedir. β -galaktozidaz enzimi sindirim, lizozomal parçalanma ve katabolizma gibi çoklu fonksiyonları nedeniyle doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak, laktazlar, yalnızca memeli bağırsağında ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır [29]. Laktaz enzimi ince bağırsakta bağırsak epiteli yüzeyindeki fırça kılı biçimindeki yapıların mukozal hücrelerinde lokalize olarak bulunmaktadır [30]. Laktözün bağırsakta hidrolizinin ardından oluşan monosakkaritler bağırsak

yüzeyinde absorbe edilmektedir. Laktaz aktivitesinin yetersiz olması ya da hiç olmaması durumu laktöz intoleransı veya laktaz eksikliği şeklinde isimlendirilmektedir ve bu durum laktözün monosakkaritlerine metabolize olmasına izin vermemektedir [31]. Eğer bağırsaklarda laktaz aktivitesi yoksa ya da yetersiz ise sindirilmeden kalan laktöz ozmotik dengeyi bozarak bağırsak içinde sıvı ve elektrolit birikmesine neden olmakta, genişleyen bağırsaklarda hareketlilik artmakta ve ishal ortaya çıkmaktadır. Öte yandan serbest halde yıkılmadan kalın bağırsaklara ulaşan laktöz buradaki bakteriler tarafından fermente edilmekte ve fermentasyon sonucunda hidrojen, metan ve karbondioksit gazları ortaya çıkmaktadır [32]. Laktöz intoleransının başlıca belirtileri; aşırı gaz, şişkinlik, bulantı ve sulu ishal gibi sindirim sistemine ilişkin belirtilerdir [28]. Dünya üzerindeki yetişkinlerin yaklaşık 2/3'ü laktöz intoleransından dolayı sıkıntılar yaşamaktadır. Laktöz intoleransı özellikle Afrika ve Asya da sık görülen bir rahatsızlık iken Avrupa'da laktöz intoleransı görülme sıklığı ülkelere göre %2'den (İskandinavya) %70'e kadar (Sicilya) değişim göstermektedir [32, 33]. Sütteki laktöz miktarının belirlenmesi laktöz intoleransından kaynaklanan rahatsızların önlenmesi açısından önem teşkil etmektedir [34]. Laktöz intoleranslı tüketiciler için laktözün enzimatik hidrolizi ile elde edilen laktözsüz sütler üretilmektedir. Sütün laktaz ile işlenmesi ile elde edilen sütlerde halen bir miktar kalıntı laktöz kalabilmektedir. Bu nedenle laktözsüz sütlerde de laktöz miktarının belirlenmesi önemlidir.



Şekil 2. α ve β Laktözün yapısal formülü (Haworth gösterimi) [28]

Sütteki laktöz miktarı elde edildiği kaynağa göre oldukça farklılık göstermektedir. İnsan, inek, keçi ve koyun sütlerinde yaklaşık laktöz miktarları sırasıyla %7, %4.7, %4.1 ve %4.6 olarak sıralanabilir [35]. İnek sütünün laktöz miktarı ırk, birey, meme enfeksiyonu ve özellikle de laktasyon evresi gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir [28]. Laktöz içeriği süt kalitesinin değerlendirilmesinde ve mastitisli hayvanlardan elde edilen düşük laktöz içerikli sütün belirlenmesinde temel bir indikatördür. Ayrıca laktöz peyniraltı suyunun başlıca bileşenlerinden biridir. Peynir üretilen süt işletmelerinde atık olan peyniraltı suyundaki laktöz miktarının belirlenmesi süt işletmelerindeki atık suların kontrolü için temel parametrelerden biridir. Peyniraltı suyundan elde edilip saflaştırılan laktöz gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır [36]. Bu nedenlerle laktöz miktarının belirlenmesi süt ve süt ürünleri

endüstrisinde proses ve ürünlerin kontrolü için rutin olarak yapılmaktadır [38, 39].

BİYOSENSÖRLERİN LAKTOZ TAYİNİNDE KULLANILMASI

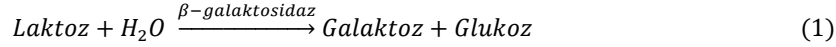
Laktözün belirlenmesi için gravimetrik [39], kolorimetrik [40], polarimetrik [41], enzimatik [42], kromatografik (gaz, sıvı ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi) [28, 43-45] ve spektroskopik (UV-Vis ve kızılötesi spektroskopisi gibi) [46, 47] yöntemler kullanılmaktadır. Sütte laktöz tayini için kullanılan bu yöntemlerin önemli bir bölümü zaman alıcı, nitelikli iş gücü gerektiren ve pahalı yöntemlerdir. Söz konusu yöntemlerin bir bölümünün süt endüstrisinde rutin kalite kontrol amacıyla kullanılması uygun görülmemektedir.

Laktoz tayininde biyosensörlerin kullanımı ucuz, kolay, güvenilir ve hızlı bir alternatif olarak görülmektedir. Bugüne kadar farklı tiplerde laktoz biyosensörleri geliştirilmiştir. Bunlar, daha çok farklı enzimlerin immobilize edildiği, amperometrik [25, 37, 45] ve iletkenlik [15] ölçümlerine dayalı sensörlerdir.

Enzim biyosensörlerinin hazırlanmasında immobilizasyon, enzimin aktivitesini muhafaza edecek şekilde transduser üzerine doğru olarak bağlanması anlamına gelmektedir. Genel olarak enzim immobilizasyonu için adsorbsiyon, tutuklama, kovalent bağlama ve çapraz bağlama olmak üzere 4 farklı metot kullanılmaktadır. Selüloz, silika jel, cam, kollajen gibi birçok madde enzimleri yüzeyleri üzerinde adsorblayabilmektedir. İmmobilize enzimlerin hazırlanması için hızlı ve basit bir yöntem olan adsorbsiyon fiziksel (Van der Waals bağlarıyla oluşan zayıf) ve kimyasal (kovalent bağlarla oluşan kuvvetli) adsorbsiyon olarak iki sınıfta incelenmektedir. Tutuklama, enzimlerin yapay ya da doğal polimer kafesleri içinde tutuklanmalarıdır. Burada öncelikle enzim ve monomer çözelti karışımı hazırlanmakta, polimerizasyon sonrası enzim polimer kafesler içerisinde tutuklanmaktadır. Enzim tutuklanmasında polimer seçimi oldukça önemlidir. Zira polimer kafesler içine substratın difüzyonu zor olabilmekte, bu durumda reaksiyon süresi uzamaktadır. Poliakrilamid ve iletken polimerler gibi materyaller enzim tutuklanmasında kullanılmaktadır. Kovalent bağlamada enzimin fonksiyonel grubu ile destek matriksi arasında bağlanma gerçekleşmektedir. Çapraz bağlama metodunda ise genellikle enzim katı destekler veya başka bir destekleyici materyal (bağlanmayı önemli derecede

arttıran çapraz bağlama ajanı) üzerine kimyasal olarak bağlanmaktadır. Çapraz bağlama adsorbe edilmiş enzimlerin stabilizasyonu için kullanılan etkin bir yöntemdir. Glutaraldehit çapraz bağlamada en çok kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir [8]. Laktoz biyosensörlerinin hazırlanmasında enzim immobilizasyonu için adsorbsiyon [48], kovalent bağlama [16], çapraz bağlama [16, 49] ve polimer matriks içerisine tutuklama [20, 50, 51] yöntemlerinin tamamı kullanılabilir.

Laktoz biyosensörü geliştirilmesi ile ilgili olarak yapılan ilk çalışmalarda biyoreseptör olarak laktoz permeaz enzimi kullanılmıştır [52, 53]. Ancak, daha sonraki yıllarda ilgili enzimin biyoreseptör olarak kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Laktoz biyosensörleri genellikle çift enzimli olarak tasarlanmaktadır. Çift enzimli laktoz biyosensörleri ile laktoz tayininin ilk aşamasında laktoz, β -galaktozidaz enzimi ile galaktoz ve glukoz hidrolize edilmektedir (Eşitlik 1). Elde edilen monosakkaritler üzerinden laktoz tayini gerçekleştirilmektedir. Galaktoz üzerinden yapılan laktoz tayininde galaktoz, oksijen ve galaktoz oksidaz enzimi varlığında D-galaktoheksodialdoz ve H_2O_2 (Eşitlik 2) [20], glukoz üzerinden yapılan tayinde ise glukoz yine oksijen ile glukoz oksidaz enzimi katalizörülüğünde glukonik asit ve H_2O_2 vermek üzere tepkimeye girmektedir (Eşitlik 3) [54]. Her iki reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenmesi ile akım artışı gerçekleşmektedir (Eşitlik 4). Bu enzimatik reaksiyonlar devam ederken harcanan laktoz miktarı elde edilen akım değişimi ile orantılıdır.



Glukoz Oksidaz Enzimi Kullanılarak Geliştirilen Laktoz Biyosensörleri

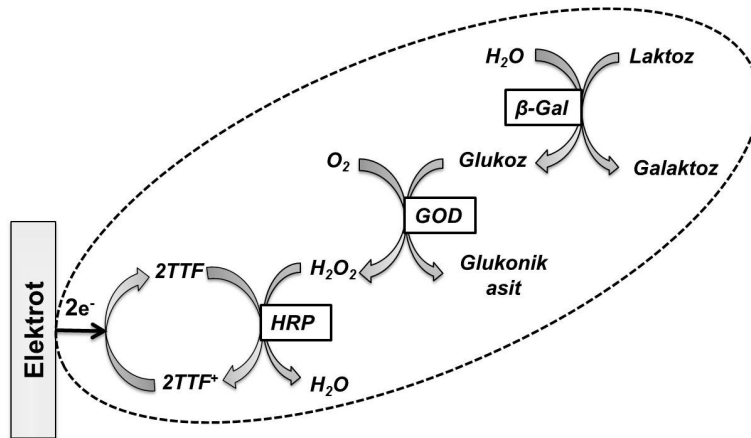
Ammam ve Fransær [55] laktoz sensörü hazırlamak için alternatif akımlı elektroforetik biriktirme yöntemi kullanarak β -galaktozidaz ve glukoz oksidaz enzimlerini platin elektrot üzerinde biriktirmişler ve sırasıyla elde edilen biyosensörle ve referans yöntemle birer adet tam yağlı (141.4 ve 139.8 mM), yarım yağlı (137.6 ve 142.9 mM) ve yağsız süt (139.1 ve 142.9 mM) örneğinde laktoz konsantrasyonlarını belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde yağ miktarının ölçüm sonuçlarını etkilemediği belirlenmiş ($p>0.05$) ve yazarlar tarafından biyosensör ve referans laboratuvar sonuçlarının oldukça uyumlu olduğu ifade edilmiştir. Yine sensör hazırlanmasında kullanılan enzim miktarlarının düşük

olması çalışma aralığının geniş ve cevap süresinin de kısa olması yöntemin avantajları olarak sıralanmıştır. Marrakchi ve ark. [15] β -galaktozidaz ve glukoz oksidaz enzimlerini kullanarak tasarladıkları konduktometrik biyosensör ile iki süt örneğinde elde ettikleri laktoz konsantrasyonlarının (5.94 ve 6.49 mg/L) üretici tarafından sağlanan laktoz değerinden (5.00 mg/L) yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada geliştirilen sensörün cevap süresi 4 dakika olarak bildirilmiştir. Jasti ve ark. [16] inek serum albümini ile kaplanmış alil glisidil eter-etilen glikol dimetakrilat kopolimeri üzerine β -galaktozidaz ve glukoz oksidaz enzimlerinin ko-immobilizasyonunu gerçekleştirerek sütte laktoz tayini için biyosensör hazırlamışlardır. Araştırmacılar tarafından bu şekilde geliştirilen biyosensörün sütteki laktozu 0.17 mg/mL gibi düşük konsantrasyonlarda doğru bir şekilde belirleyebildiği ifade

edilmiştir. Nguyen ve ark. [17] kimyasal buhar depolama tekniği kullanılarak grafen ile modifiye edilen platin (Pt) elektrot üzerine poli(1,5-diaminonaftalen) filmini elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile kaplamışlardır. Daha sonra çapraz bağlayıcı olarak %25'lik glutaraldehit çözeltisi kullanılarak β -galaktozidaz ve glukoz oksidaz immobilize ederek laktoz biyosensörü geliştirmiş ve $1.33 \mu\text{A}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ hassasiyet ve $1.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ dedeksiyon limiti elde etmişlerdir. β -galaktozidaz ve glukoz oksidaz enzim çifti kullanılarak geliştirilen diğer farklı biyosensörlerle de [54, 56-58] laktoz tayininde başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Conzuelo ve ark. [38] süt ve süt ürünlerinde laktoz miktarının belirlenmesi için 3-merkaptopropionik asit ile modifiye ettikleri altın elektrota β -galaktozidaz, glukoz oksidaz, peroksidaz ve elektron transfer aracısı molekül olan tetratiäfulvaleni (TTF), diyaliz membran kullanarak ko-immobilize etmişler ve bazı süt ve süt ürünlerinin laktoz miktarlarını belirlemeye çalışmışlardır. Yukarıda anlatılan çift enzimli laktoz biyosensörlerinden farklı olarak bu çalışmada glukozun oksijen ile glukoz oksidaz enzimi varlığında ile reaksiyonu sonucu ortaya çıkan H_2O_2 elektron transfer aracısı olan TTF ile yaban turpu peroksidazı katalizörülüğünde indirgenmektedir (Şekil 3). Bu reaksiyon sonucunda yükseltgenen tetratiäfulvalene (TTF^+), TTF/TTF^+ redoks çiftinin normal potansiyelinden daha negatif bir potansiyel uygulandığında, TTF^+ elektrot üzerinde indirgenmektedir. Söz konusu indirgenme sonucunda laktoz konsantrasyonu ile orantılı olarak bir amperometrik sinyal oluşmaktadır. Çalışmada geliştirilen

sensör ile belirlenen laktoz miktarları aynı örneklerde ticari enzim kitleleriyle de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar Student t-testi ile karşılaştırılmış ve sonuçlar arasında ($T_{\text{kritik}}=3.812>t=0.774$) istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde Eshkenazi ve ark. [1] inek sütlerinde laktoz miktarlarını belirlemek için geliştirdikleri biyosensör hazırlanması için cam karbon disk elektroduna β -galaktozidaz, glukoz oksidaz ve yaban turpu peroksidazı enzimlerini polietilenimin prosedürü ile immobilize etmişlerdir. Geliştirilen biyosensör ile 12 farklı süt numunesinin laktoz konsantrasyonları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar referans laboratuvar sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İlgili çalışmada elde edilen değerlere Student t testi uygulandığında ($p=0.15$) biyosensör sonuçları ile referans laboratuvar sonuçlarının istatistiksel olarak benzer olduğu bulunmuştur. Yapılan diğer bir çalışmada süt örneklerinde laktoz tayini için β -galaktozidaz, glukoz oksidaz ve katalaz enzimlerini içeren kablosuz bir biyosensör geliştirilmiştir [59]. Bu çalışmada enzimler daha önceden pH-duyarlı polimer tabaka ile kaplı magnetoelastik şerit benzeri sensör üzerine aynı anda immobilize edilmiştir. β -galaktozidaz ve glukoz oksidaz enzimleri içeren amperometrik biyosensörlerden farklı olarak bu sistemde enzimatik reaksiyonlar sonucu glukonik asit oluşurken pH duyarlı polimer büzülme ve buna bağlı olarak sensörün laktoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olan rezonans frekansı artmaktadır. Bu şekilde geliştirilen biyosensörün tayin limiti 0.72 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 3. Sütte laktoz miktarının belirlenmesi için 3-merkaptopropionik asit ile modifiye edilen altın elektrota β -galaktozidaz (β -gal), glukoz oksidaz (GOD), yaban turpu peroksidazı (HRP) ve elektron transfer aracısı molekül olan tetratiäfulvalenin (TTF) diyaliz membrana immobilize edilmesiyle elde edilen biyosensörün çalışma prensibi ([38]'dan uyarlanmıştır)

Galaktoz Oksidaz Enzimi Kullanılarak Geliştirilen Laktoz Biyosensörleri

Konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada [50] galaktoz oksidaz enzimi katyonik amfifilik pirolün elektropolimerizasyonu sonucu elde edilen polipirol matrisi içerisinde elektrot yüzeyine tutuklanmıştır.

Galaktoz ve laktoz tayini için geliştirilen söz konusu biyosensörde elektrot cevabı enzimatik olarak oluşturulan H_2O_2 'nin elektrokimyasal olarak belirlenmesi temellidir. Bir başka çalışmada poli (3-hekziltiyofen) P3TH/stearik asidin (SA) Langmuir-Blodgett (LB) filmleri üzerine β -galaktozidaz ve galaktoz oksidaz enzimlerinin immobilizasyonu ile amperometrik bir biyosensör

geliştirilmiştir. Çalışmada geliştirilen elektrotların 1-6 g/dL laktozun tayininde kullanılabilmesi, elektrotların 40°C'ye kadar stabil olduğu ve 4°C'de 120 gün saklanabileceği tespit edilmiştir. Yine çözelti ortamında yapılan çalışmalarda laktoz tayini sırasında askorbik asit, ürik asit ve kalsiyum klorür gibi muhtemel bileşiklerle girişim belirlenmemiştir [25]. Gürsoy ve ark. [20] tarafından laktoz tayini için iletken polimer bazlı biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada, β -galaktozidaz ve galaktoz oksidaz enzimleri sodyum dodesilbenzen sülfonik asit varlığında polipirol matrisi içerisine elektropolimerizasyon işlemi ile immobilize edilmiştir. Hazırlanan enzim elektrodun laktoza karşı cevabı dönüşümlü voltmetri (CV) yöntemiyle laktozun yükseltildiği +0.4 V'daki akım değerine göre belirlenmiştir. Bu şekilde geliştirilen biyosensörün cevap süresi 8-10 saniye ve tayin limiti 2.6×10^{-6} M olarak tespit edilmiştir.

Sellobiyoz Dehidrojenaz Enzimi Kullanılarak Geliştirilen Laktoz Biyosensörleri

Laktoz biyosensörlerinin geliştirilmesinde β -galaktozidaz + glukoz oksidaz ve β -galaktozidaz + galaktoz oksidaz enzim çiftlerinin dışında farklı enzimlerin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmaların birinde Stoica ve ark. [48] beyaz çürükçül mantarlar *Trametes villosa* ve *Phanerochaete sordida*'dan izole edilen iki yeni sellobiyoz dehidrojenaz enzimini kullanmışlar ve ilgili enzimler ile katı bir spektrografik grafit elektrot arasında oldukça etkili elektron transferine dayalı bir sensör tasarımı gerçekleştirmişlerdir. Araştırmada *P. sordida*'dan izole edilen sellobiyoz dehidrojenaz enzimi ile geliştirilen laktoz biyosensörünün $1\mu\text{M}$ laktoz belirleme limiti, 1100 $\mu\text{A.mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ hassasiyet, 4 saniye cevap süresi ve 1-100 μM arasında doğrusal çalışma aralığı gibi değerlerle *T. villosa* sellobiyoz dehidrojenazı ile tasarlanan biyosensörden daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Çalışmada geliştirilen biyosensörün stabilitesi 11 saat boyunca 100 μM sürekli laktoz enjeksiyonu (toplam 290 enjeksiyon) ile test edilmiş kararlılığının son derece iyi (son okumadaki sensör cevabının ilk okumadaki cevabın %98'i) olduğu belirlenmiştir. *P. sordida*'dan izole edilen sellobiyoz dehidrojenaz enziminin kullanıldığı başka bir çalışmada [60] enzim ile tek duvarlı karbon nanotüpleri arasındaki elektron transferinden yararlanılarak laktoz tayini gerçekleştirilmiştir. Kullanılan karbon nanotüpleri p-fenildiaminin aril diazonyum tuzları ile modifiye edildikten sonra kullanılmış ve geliştirilen biyosensör pH 3.5'de maksimum akım yoğunluğu göstermiştir. Geliştirilen laktoz biyosensörünün tespit limiti, doğrusal çalışma aralığı, ölçüm hassasiyeti, cevap süresi ve sensör stabilitesi sırasıyla 0.5 μM , 1-150 μM , 476.8 $\text{nA.mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$, 4 saniye ve 12 gün (yarılanma ömrü) olarak tespit edilmiştir. Yakovleva ve ark. [49], laktoz tayini için basidiomiset mantarı *Phanerochaete chrysosporium*'den izole edilen sellobiyoz dehidrojenaz enzimi ile laktozun oksidasyonuna dayalı termometrik-amperometrik kombine bir biyosensör tasarlamıştır. Çalışmada enzim, enzim reaktöründe immobilize edilmiştir. Reaktör, sellobiyoz

dehidrojenazın aminopropil-silanlanmış kontrollü gözenekli cam boncuklar üzerine, glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanmıştır. Kombine biyosensör, (i) elektron alıcısı olarak *p*-benzokinon kullanılarak laktozun enzimatik oksidasyonu ile ilişkili termometrik sinyal ve (ii) oluşan hidrokinonun oksidasyonu ile ilişkili elektrokimyasal akımı eşzamanlı belirleyecek şekilde geliştirilmiştir. Tasarlanan biyosensörün 0.05 mM ile 30 mM arasındaki laktoz konsantrasyonlarında oldukça yüksek tekrarlanabilirlikte doğrusal cevap verdiği ve tayin süresinin örnek başına 2 dakika olduğu bulunmuştur.

Diğer Laktoz Biyosensörleri

Amarita ve ark. [61] tarafından laktozim ile β -galaktozidaz enzimleri ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak bir hibrit laktoz biyosensörü geliştirilmiştir. Çalışmada *S. cerevisiae* agar üzerine tutuklanırken laktozim ile β -galaktozidaz dietilaminoetil selüloz üzerine adsorbe edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ilgili maya ve enzim, CO₂ elektrodunun gaz geçirgen membranı ile bir diyaliz membranı arasına tutturulmuştur. Tayin sırasında öncelikle laktoz, laktazlar tarafından hidrolize edilmekte, ardından açığa çıkan glukoz ve galaktoz *S. cerevisiae* tarafından fermente edilmekte ve fermentasyon sonucunda CO₂ açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan CO₂ ise CO₂ elektrodu ile ölçülerek laktoz tayini gerçekleştirilmektedir.

Laktoz tayini ile ilgili geliştirilen diğer bazı biyosensör çalışmalarına ait bir kısım bilgiler Tablo 2'de özetlenmektedir.

SONUÇ

Biyosensörlerin basit kullanım özellikleri, yüksek duyarlılık, kısa analiz süresi, düşük analiz maliyeti ve gerçek zamanlı ölçümlere uygulanma potansiyelleri gibi özellikleri nedeniyle gıda işleme endüstrisinin de içinde bulunduğu birçok alanda geniş uygulama alanları bulunmaktadır. Süt ve süt ürünleri endüstrisinde laktoz miktarının rutin olarak belirlenmesi proses ve ürünlerin kontrolü için son derece önemlidir. Sütte laktoz tayini için kullanılan yöntemlerin bir bölümü zaman alıcı, nitelikli iş gücü gerektiren ve pahalı yöntemlerdir. Laktoz tayininde biyosensörlerin kullanımı önemli bir alternatif olarak görülmektedir ve bu nedenle son yıllarda laktoz biyosensörü geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda artış dikkati çekmektedir. Bugüne kadar geliştirilen laktoz biyosensörleri daha çok farklı enzimlerin (β -galaktozidaz, glukoz oksidaz, galaktoz oksidaz, sellobiyoz dehidrojenaz, peroksidaz vb.) immobilize edildiği, amperometrik ve iletkenlik ölçümü temelli sensörlerdir. Laktoz biyosensörü geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda enzim immobilizasyonu için adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama ve polimer matris içerisine tutuklama gibi farklı yöntemler kullanılmıştır. Yapılan araştırmalarda glukoz oksidaz enziminin maliyetinin düşük olması ve laktoz tayini sırasında daha iyi cevap vermesi gibi nedenlerle galaktoz oksidaz enzimine

göre daha fazla tercih edildiği dikkat çekmektedir. Geliştirilen laktoz biyosensörlerinin bir kısmı yalnızca çözelti ortamında denenirken bir kısmının farklı yağ oranlarına sahip süt numunelerinde laktoz konsantrasyonunu belirleme potansiyelleri araştırılmış ve son derece olumlu sonuçlar alınmıştır. Konu ile ilgili olarak

yapılacak yeni çalışmaların desteklenmesi hızlı, kullanım kolaylığı olan, ekonomik, kararlı ve düşük tayin sınırlarına sahip ideal laktoz biyosensörlerinin geliştirilmesi açısından önemli görülmektedir.

Tablo 2. Laktoz tayini ile ilgili geliştirilen bazı biyosensör çalışmalarına ait bilgiler

Yöntem	Kullanılan Materyal	Enzimler	Tayin Limiti ve/veya Doğrusal Çalışma Aralığı	Kaynak
Amperometrik	Nafyon-N-metil fenazin metosülfat	<ul style="list-style-type: none"> • β-Galaktozidaz • Galaktoz oksidaz • Yabanutru peroksidazı 	75 nM	[62]
Amperometrik	Beta-siklodekstrin ferrosen	<ul style="list-style-type: none"> • β-Galaktozidaz • Glukoz oksidaz • Mutarotaz 		[63]
Amperometrik	Civa ince filmle modifiye edilmiş camısı karbon elektrot	<ul style="list-style-type: none"> • β-Galaktozidaz • Glukoz oksidaz 	0.1-3.5 mM	[64]
Amperometrik	Screen printed karbon elektrot	<ul style="list-style-type: none"> • Sellobiyoz dehidrogenaz 	250 nM / 0.5-200 μ M	[65]
Kemilüminesans reaktör	Amin modifiye nano boyutlu silika ve kalsiyum alginat lif	<ul style="list-style-type: none"> • β-Galaktozidaz • Glukoz oksidaz 	27 ng/mL / 80 ng/mL– 4 μ g/mL	[57]
Termometrik-Amperometrik	Aminopropil silanlanmış cam	<ul style="list-style-type: none"> • Sellobiyoz dehidrogenaz 	0.05-30 mM	[49]
Amperometrik	Polikarbomol sülfonat hidrojen	<ul style="list-style-type: none"> • β-Galaktozidaz • Glukoz oksidaz 	0.0035-2 mM	[37]
Amperometrik	Jelatin	<ul style="list-style-type: none"> • β-Galaktozidaz • Glukoz oksidaz 		[66]

KAYNAKLAR

- [1] Eshkenazi, I., Maltz, E., Zion, B., Rishpon, J., 2000. The three-cascaded enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk. *Journal of Dairy Science* 83: 1939-1945.
- [2] Smutok, O., Gayda, G., Dmytruk, K., Klepach, H., Nisnevitch, M., Sibirny, A., Puchalski, C., Broda, D., Schuhmann, W., Gonchar, M., Sibirny, V., 2011. Biosensors - Emerging Materials and Applications (Editor: Serra, P. A.), Intech, Croatia, pp. 401-446.
- [3] Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S., 1999. Electrochemical biosensors: recommendation definitions and classification. *Pure Applied Chemistry* 71: 2333-2348.
- [4] Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S., 2001. Electrochemical biosensors: recommendation definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics* 16: 121-131.
- [5] Telefoncu, A., 1999. Biyoensörler. (Editör: Telefoncu, A.) Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.
- [6] Shaikh, S.M., Patil, M.A., 2012. Analysis, designing and working principal of optical fiber (OF) biosensors. *International Journal of Engineering and Sciences* 1: 52-57.
- [7] Vargas-Bernal, R., Rodriguez-Miranda, E., Herrera-Perez, G., 2012. Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides. (Editor: Soundararajan, R.P.), Intech, Croatia, pp. 329-356.
- [8] Zhao, Z., Jiang, H., 2010. Biosensors. (Editor: Serra, P. A.) Intech, Croatia, pp.1-21.
- [9] Malhotra, B.D., Singhal, R., Chaubey, A., Sharma S.K., Kumar, A., 2005. Recent trends in biosensors. *Current Applied Physics* 5: 92-97.
- [10] Bahadır, E.B., Sezgentürk, M.K., 2015. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biotreat/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry* 478: 107-120.
- [11] Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B.D., 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 17: 345-359.
- [12] Mello, L.D., Kubota, L.T., 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 77: 237-256.
- [13] Otlu, B., 2011. Biyosensörler: biyoreseptör moleküller. 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), 16-18 Mayıs, Bildiriler Kitabı Sayfa: 5-7, Elazığ.
- [14] Luong, J.H.T., Male, K.B.M., Glennon, J.D., 2008. Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnology Advances* 26: 492-500.
- [15] Marrakchi, M., Dzyadevych, S.V., Lagarde, F., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., 2008. Conductometric biosensor based on glucose oxidase and beta-galactosidase for specific lactose determination in milk. *Materials Science and Engineering C* 28: 872-875.
- [16] Jasti, L.S., Dola, S.R., Fadnavis, N.W., Addepally, U., Daniels, S., Ponrathnam, S., 2014. Co-immobilized

- glucose oxidase and –galactosidase on bovine serum albumin coated allyl glycidyl ether (AGE)-ethylene glycol dimethacrylate (EGDM) copolymer as a biosensor for lactose determination in milk. *Enzyme and Microbial Technology* 64-65: 67-73.
- [17] Nguyen, B.H., Nguyen, B.T., Vu, H.V., Nguyen, C.V., Nguyen, D.T., Nguyen, L.T., Vu, T.T., Tran, L.D., 2016. Development of label-free electrochemical lactose biosensor based on graphene/poly(1,5-diaminonaphthalene) film. *Current Applied Physics* 16: 135-140.
- [18] Manowitz, P., Stoecker, P.W., Yacynych, A.M., 1995. Galactose biosensors using composite polymers to prevent interferences. *Biosensors & Bioelectronics* 10: 359-370.
- [19] Sharma, S.K., Suman, Pundir, C.S., Sehgal, N., Kumar, A., 2006. Galactose sensor based on galactose oxidase immobilized in polyvinyl formal. *Sensors and Actuators B* 119: 15-19.
- [20] Gürsoy, O., Celik G., Sen Gürsoy, S. 2014. Electrochemical biosensor based on surfactant doped polypyrrole (PPy) matrix for lactose determination. *Journal of Applied Polymer Science* 131: 40200.
- [21] Cosnier, S., Gondran, C., Watelet, J.-C., Giovani, W.D., Furriel, R.P.M., Leone, F.A. 1998. A bienzyme electrode (alkaline phosphatase-polyphenol oxidase) for the amperometric determination of phosphae. *Anal. Chem.* 70: 3952-3956.
- [22] Akyilmaz, E., Turemis, M., 2010. An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine. *Electrochimica Acta* 55: 5195-5199.
- [23] Kafi, A.K.M., Wu,G., Chen, A., 2008. A novel hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto Au-modified titanium dioxide nanotube arrays. *Biosensors and Bioelectronics* 24: 566-571.
- [24] Li, W., Yuan, R., Chai, Y., Zhou, L., Chen, S., Li, N., 2008. Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan/silica sol-gel hybrid membranes for the preparation of hydrogen peroxide biosensor. *J. Biochem. Biophys. Methods* 830-837.
- [25] Sharma, S.K., Singhal, R., Malhotra, B.D., Sehgal, N., Kumar, A., 2004. Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene). *Biosensors and Bioelectronics* 20: 651-657.
- [26] Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S., 1987. *Biosensors Fundamentals and Applications*. Oxford Univeristy Press, Oxford
- [27] Kress-Rogers, E., 1998. *Instrumentation and Sensors for the Food Industry*; Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.
- [28] Fox P.F., McSweeney, P.L.H., 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Kluwer Academic Publishers, New York.
- [29] Dekker, P.J.T., Daamen, C.B.G., 2011. Enzymes exogenous to milk in dairy technology. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Eds. Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H.), Volume 2, Academic Press, London, pp. 276-282.
- [30] Swallow, D.M., 2011. Lactose intolerance. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Eds. Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H.), Volume 3, Academic Press, London, pp. 236-239.
- [31] Alm, L. 2002. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Editors: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F.) Academic Press, London, pp. 1533-1539.
- [32] Gürsoy, O., Kınık, Ö., Gönen, İ., 2005. Probiyotikler ve gastrointestinal sağlığa etkileri. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* 35: 136-148.
- [33] Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W., Gibson, G.R., 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today* 8: 692-700.
- [34] Rasooly, A., Herold, K.E., 2011. Biosensors. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Eds. Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H.), Volume 1, Academic Press, London, pp. 235-240.
- [35] Schaafsma, G., 2002. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (Editors: Roginski, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F.) Academic Press, London, pp. 1529-1533.
- [36] De Souza, R.R., Bergamasco, R., Da Costa, S.C., Feng, X., Faria, S.H.B., Gimenes, M.L., 2010. Recovery and purification of lactose from whey. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 49: 1137-1143.
- [37] Loechel, C., 1998. Amperometric bi-enzyme based biosensor for the determination of lactose with an extended linear range. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207: 381-385.
- [38] Conzuelo, F., Gamella, M., Campuzano, S., Ruiz, M.A., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M., 2010. An integrated amperometric biosensor for determination of lactose in milk and dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 58: 7141-7148.
- [39] AOAC, 2005a. AOAC Official Method 930.28. Lactose in milk. Gravimetric method. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- [40] Abu-Lehia, I.H., 1987. A simple and rapid colorimetric method for lactose determination in milk. *Food Chemistry* 24: 233-240.
- [41] AOAC, 2005. AOAC Official Method 896.01-1896. Lactose in milk. Polarimetric method. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- [42] AOAC, 2005. AOAC Official Method 984.15. Lactose in milk. Enzymatic method. Official Methods of Analysis of AOAC International.
- [43] Harvey, J., 1988. A high performance liquid chromatography method for lactose determination in milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 43: 19-20.
- [44] IDF, 2007. ISO 22662:2007 (IDF 198:2007). Milk and milk products: Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference method).
- [45] Adanyi, N., Szabo E.E., Varadi, M., 1999. Mutli-enzyme biosensors with amperometric detection for

- determination of lactose in milk and dairy products. *Eur. Food. Res. Technol.* 209: 220-226.
- [46] Luinge, H.J., Hop, E., Lutz, E.T.G., van Hemert, J.A., de Jong, E.A.M., 1993. Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 284: 419-433.
- [47] Petrushevska-Tozi, L., Bauer-Petrovska, B., 1997. Spectrophotometric determination of lactose in milk with PdCl₂. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2112-2114.
- [48] Stoica, L., Ludwig, R., Haltrich, D., Gorton, L., 2006. Third-generation biosensor for lactose based on newly discovered cellobiose dehydrogenase. *Anal. Chem.* 78: 393-398.
- [49] Yakovleva, M., Buzas, O., Matsumura, H., Samejima, M., Igarashi, K., Larsson, P.O., Gorton, L., Danielsson B., 2012. A novel combined thermometric and amperometric biosensor for lactose determination based on immobilised cellobiose dehydrogenase. *Biosensors and Bioelectronics* 31: 251-256.
- [50] Cosnier, S., Innocent, C., 1994. Detection of galactose and lactose by a poly(amphiphilic pyrrole)-galactose oxidase electrode. *Analytical Letters* 27(8): 1429-1442.
- [51] Cosnier, S., 1998. Fabrication of amperometric biosensors by entrapment of enzymes in functionalized polypyrrole films. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 76: 1000-1007.
- [52] Klee, B., John, E., Jähnig, F., 1992. A biosensor based on the membrane protein lactose permease. *Sensors and Actuators B: Chemical* 7(1-3): 376-379.
- [53] Ottenbacher, D., Jähnig, F., Göpel, W., 1993. A prototype biosensor based on transport proteins: electrical transducers applied to lactose permease. *Sensors and Actuators B: Chemical* 13(1-3): 173-175.
- [54] Svorc, J., Miertus, S., Barlikova, A., 1990. Hybrid biosensor for the determination of lactose. *Anal. Chem.* 62: 1628-1631.
- [55] Ammam M., Fransaer, J., 2010. Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical* 148: 583-589.
- [56] Ferreira, L.S., Trierweiler, J.O., De Souza, M.B., Folly, R.O.M., 2004. A lactose FIA-biosensor system for monitoring and process control. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 21(2): 307-315.
- [57] Yang, C., Zhang, Z., Shi, Z., Xue, P., Chang, P., Yan, R., 2010. Application of a novel co-enzyme reactor in chemiluminescence flow-through biosensor for determination of lactose. *Talanta* 82: 319-324.
- [58] Rajendran, V., Irudayaraj, J., 2002. Detection of glucose, galactose, and lactose in milk with a microdialysis-coupled flow injection amperometric sensor. *Journal of Dairy Science* 85(6): 1357-1361.
- [59] Yang, W., Pang, Pengfei, P., Gao, X., Cai, Q., Zeng, K., Grimes, C.A., 2007. Detection of lactose in milk samples using a wireless multi-enzyme biosensor. *Sensor Letters* 5(2): 405-410.
- [60] Tasca, F., Ludwig, R., Gorton, L., Antiochia, R., 2013. Determination of lactose by a novel third generation biosensor based on a cellobiose dehydrogenase and aryl diazonium modified single wall carbon nanotubes electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* 177: 64-69.
- [61] Amarita, F., Fenandez, C.R., Alkorta, F., 1997. Hybrid biosensors to estimate lactose in milk. *Analytica Chimica Acta* 349: 153-158.
- [62] Liu, H., Ying, T., Sun, K., Li, H., Qi, D., 1997. Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on N-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode. *Analytica Chimica Acta* 344: 187-199.
- [63] Liu, H., Li, H., Ying, T., Qi, D., 1998. Amperometric biosensor sensitive to glucose and lactose based on co-immobilization of ferrocene, glucose oxidase, beta-galactosidase and mutarotase in beta-cyclodextrin polymer. *Analytica Chimica Acta* 358(2):137-144
- [64] Göktuğ, T., Sezgintürk, M. K., Dinçkaya, E., 2005. Glucose oxidase- β -galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination. *Analytica Chimica Acta* 551: 51-56.
- [65] Safina, G., Ludwig, R., Gorton, L., 2010. A simple and sensitive method for lactose detection based on direct electron transfer between immobilised cellobiose dehydrogenase and screen-printed carbon electrodes. *Electrochimica Acta* 55: 7690-7695.
- [66] Loğoğlu, E., Sungur, S., Yıldız, Y., 2006. Development of lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase immobilized into gelatin. *Journal of Macromolecular Science, Part A* 43(3): 525-533.