

Li, Yanbin. 2006. Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA: ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers.

Çevirmenler: Pınar DEMİRCİOĞLU ve İsmail BÖĞREKÇİ

Çeviri Editörleri: Sefa TARHAN ve Mehmet Metin ÖZGÜVEN

2.3 Biyosensörler

Yazar:Y.Li

Çevirmenler: Pınar DEMİRCİOĞLU ve İsmail BÖĞREKÇİ

Özet: Bir biyosensör, temel olarak bir biyoalgılama materyali ve bir transdüser içerir ve biyolojik ve kimyasal etken maddelerin tespitinde kullanılır. Enzimler, antikorlar, nükleik asit incelemeleri, hücreler, dokular ve organeller de dâhil olmak üzere biyoalgılama materyalleri, elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, termal ve manyetik cihazlar gibi hedef analitler ve transdüserleri seçerek tanıyabilir ve nicel olarak izleyebilir. Biyosensörler, moleküler biyoloji, mikrokışkanlar ve nanomateryaller gibi yeni teknolojilerle bir araya gelerek, tarımsal üretim, gıda işleme ve çevresel izleme faaliyetlerinde, bitkilerde, hayvanlarda, gıdalarda, toprakta, hava ve suda, pestisitler, antibiyotikler, patojenler, toksinler, proteinler, nutrilitler, kötü kokular, mikroplar ve daha fazlasını hızlı, spesifik, hassas, düşük maliyetli, çalışma alanında, on-line ve/veya gerçek-zamanlı kullanılabilirler.

Anahtar Kelimeler: Biyosensörler, Biyoalgılama malzemeleri, Transdüserler, Biyolojik etken maddeler, Kimyasal etken maddeler

2.3.1. Giriş

Biyosensörler üzerinde son kırk yıldır çalışmalar yapılmış ve gelişmeler kaydedilmiştir. Biyolojik ve kimyasal etken maddelerin tarımsal üretim, gıda işleme ve çevresel izleme yanında klinik teşhisler, ilaç testleri, biyoişleme, biyolojik savaş ve anti-biyoterörizm alanlarının tespit edilmesi konusunda son yıllarda özellikle dikkat çekmiştir.

Bu bölümde, biyosensörlerin tarihi ve gelişiminin yanında ve tanımları üzerinde kısaca duracak; biyosensörleri, biyoalgılama materyalleri ve dönüştürme metotlarına göre sınıflandıracamız. Tarım, gıda ve çevre alanlarında biyosensör uygulamalarını özetleyecek ve en sonunda bazı ticari biyosensör ürünlerinden bahsedeceğiz.

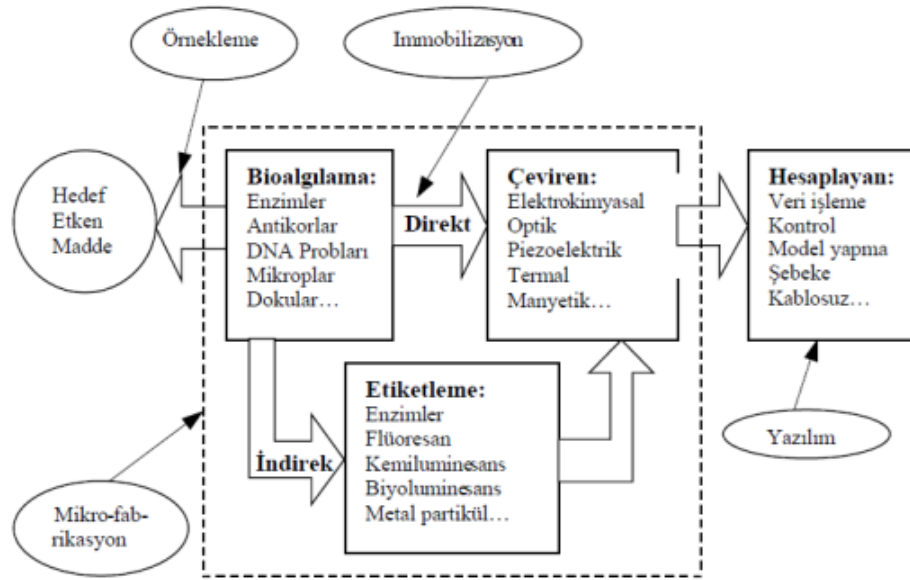
2.3.2. Biyosensörlerin Tanımı

Biyosensör terimi farklı şekillerde kullanılmaktadır. Ancak genellikle, bir biyosensör, biyolojik veya kimyasal etken bir maddeye seçici olarak, hızla ve sürekli şekilde reaksiyon göstermeli ve alttaki özelliklere sahip olmalıdır:

- Biyoaktif veya bir biyoalgılama materyali içermelidir;
- Bu materyal ilgi duyulan türdeki maddeleri ya da bir analiti tanımalı; ve
- Biyoalgılama materyali bir transdüser adı verilen aygıtla yakın temas içindedir.

Genel olarak biyosensör; biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal sinyali ölçülebilir ve işlenebilir elektriksel sinyale dönüştürebilen, kimyasal veya fiziksel transdüser ile birleştirilmiş biyolojik algılama materyali içeren bir cihaz veya enstrümandır [1-4].

Şekil 1'de gösterildiği gibi, biyosensörlerde kullanılan biyoalgılama materyalleri arasında enzimler, antikorlar, nükleik asitler, tam hücreler, reseptörler, dokular, organeller ve daha fazlasını sayabiliriz.



Şekil 1. Bir biyosensörün tipik yapısı ve bileşenleri.

Biyosensörde kullanılan transdüser, elektrokimyasal (voltametri, amperometrik, potansiyometrik, iletken, kapasitif, impedans olanlarda dahil), optik (emilim, yüzey plazmon rezonans, kimyasal ışıltama (kemiluminesans), biyolojik ışıltama (biyoluminesans), floresans, optik fiber olanlar da dahil), piezoelektrik (kuartz kristal mikrobalsans, yüzey ses (akustik) dalgası), kalorimetrik, manyetik ve diğerleri olabilir. Biyoalgılama materyali, transdüserle tespit edilebilir sinyal gönderir, label free biyosensör oluşturmak için transdüserle doğrudan bağlı olabilir. Bazı uygulamalar için, etiketlere biyolojik sinyalleri güçlendirmek için ihtiyaç duyulabilir. Bunlar, enzimler, ışıtma, kimyasal ışıtma, biyolojik ışıtma ve metal

partiküller, özellikle nanopartiküller olabilir. Bir işlem birimi, genellikle veri teminine ve kontrolüne, veri tabanına ve modelleme kullanımına, ağ bağlantısına ve kablosuz iletişime ihtiyaç duyar. Biyogölgeleme materyalleri transdüserlere bağlamak için etkin bir sabitleme tekniği kullanmak zorunludur. Örnekleme süreci, belirli ve tespit edilebilir sinyallerin alınmasında hedef analitlerin ayrıştırılması ve konsantrasyonu için kritik öneme sahiptir. Daha küçük ve otomatik biyosensörlere doğru gidildikçe, gelişmiş mikro üretim (mikro fabrikasyon) ve yazılıma gereksinim duyulmaktadır.

Bir biyosensör, örnekleme, algılama, çevirme ve hesaplama içeren bir sistem olabilir. Biyosensör teknolojisi, biyoloji, kimya ve mühendisliği kapsayan disiplinler arası yaklaşım üzerine bina edilmiştir.

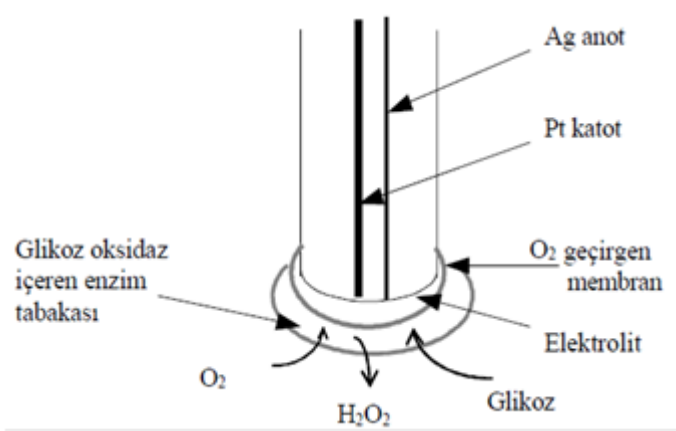
2.3.3 Biyosensörlerin Tarihi

İlk biyosensör, Clark ve Lyons [5] tarafından bir enzim-elektrotu üzerine yaptıkları çalışmada tanımlanmıştır. Bu çalışmada, bir oksido-indirgeyici enzim, bir platin elektrotunun yanında bir a membran sandviç içinde tutulmuştur (Şekil 2). -0.7 V'de polarize edilmiş platin katot, maddeyle enzimin reaksiyonu sonucu ortaya çıkan peroksite reaksiyon göstermiştir.

Bu sistem için temel hedef maddesi glikozdu. Glikoz oksidasyon reaksiyonu, glikoz oksidaz ile katalize edilmiştir ve şöyle ifade edilebilir:



Elektrotta:



Şekil 2. Glikoz tespiti için bir Clark enzim elektrotunun şematik diyagramı.

Platin ve gümüş elektrotları arasında uygulanan gerilim, oksijeni indirgemek için yeterlidir ve oksijen konsantrasyonu ile orantılı olan elektrik akımı ölçülebilmektedir. Bunu takiben glikoz konsantrasyonu, akımdaki azalmayla doğru orantılıdır. Elektrot, politen veya selofan gibi geçirgen bir oksijen membranı ile

kaplanmıştır. Bir enzim tabakası (glikoz oksidaz) bu membranın üzerine yerleştirilir ve burada asetat gibi ikinci bir membran ile tutturulur.

Bu çalışma, 1974 yılında ilk defa piyasada görülen Yellow Springs Instruments (Model 23YSI, Yellow Springs, OH) firmasını, biyosensör ürününe götürmüştür. Aynı prensip ve tasarım daha sonra birçok oksijen-aracılı oksido-redüktaz enzimli biyosensörlerde uygulanmıştır. Aynı zamanda, bir biyosensör genellikle *enzim elektrodu* veya *biyoelektrot* olarak adlandırılır. Çünkü belirli bir biyolojik veya kimyasal olayı enzimatik bir reaksiyon aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak tespit etmek için biyoalgılama materyali olarak bir enzim veya biyolojik olarak tanımlanmış eleman kullanılır.

Biyosensörlerin geliştirilmesinde bir sonraki önemli buluş, Guilbault ve Montalvo [6] tarafından yayımlanan içinde biyolojik olarak tanımlanmış molekülün diyaliz membranının arkasındaki temel sensörün çevresinde tutulduğu potansiyometrik üre elektrotuydu.

Bu tip elektrot birinci nesil biyosensörler [7] olarak sınıflandırılmışlardır. İkinci nesil biyosensörler olarak, biyoalgılama materyalinin immobilizasyonu, modifiye edilmiş transdüser arabirimlerinde veya bunların transdüser yüzeyinde bir polimer matris içine dâhil ederek çapraz-bağlantılı ayıraç maddeler veya iki işlevli ayıraç maddeler kullanılarak elde edilmiştir.

Tipik olarak, transdüser yüzey, biyoalgılama materyalinin eklerini takiben kimyasallarla modifiye edilmiştir. ELISA (enzim ilintili immün test) elektrotları bu gruba dâhildir.

Üçüncü nesil biyosensörler için yüzey plazmon rezonans biyosensörlerde (SPR, Surface Plasmon Resonance) olduğu gibi biyomolekül, biyoalgılama materyalinin dahili bir parçası haline gelir. Dördüncü nesil biyosensörlerin MEMS/NEMS/BioNEMS (mikro, nano veya biyonano elektromekanik sistemler), nanoteknoloji ve biyoteknoloji ile daha fazla özelliğe sahip olması beklenebilir.

Biyoteknolojik gelişmeler, biyomoleküller ve biyomoleküler etkileşimlerinin daha iyi anlaşılması da dâhil olmak üzere, biyosensör teknolojisi moleküler tanımlama ve çoğu biyokimyasal reaksiyonun elektronik ve optik teknolojisinin sinyal işleme ve iletme yükseltilmesi kabiliyetleriyle bütünleştirilmesini sağlamıştır. Bilim adamlarının ve mühendislerin farklı alanlardaki katkılarıyla, biyosensör kimya ve biyokimya, fizik, biyoloji, bilgisayar ve mühendislik gibi yeni çoklu disiplin alanlarında büyük çaplı yaratıcı biyosensör geliştirme fırsatlarıyla ortaya çıkmıştır. Mühendisler, biyosensörlerin tasarım ve üretimlerinde, biyosensörlerin uygulamalarında olduğu gibi önemli rol oynamaktadır.

Biyosensörlerin önemli uygulaması, öncelikle klinik teşhisler üzerine gerçekleşmiştir. Glikoz sensörler, günümüzde bile en başarılı ve en geniş kapsamlı olanlarıdır. Daha sonra, biyosensör teknolojisi kan örneklerinin analizinde, bulaşıcı hastalıkların teşhisinde ve ilaç taramasında uygulanmıştır. Bunun ötesinde, biyosensörler, tarımsal üretim, gıda analizi, ve çevresel izlemenin yanında

madencilik, biyoişlem, biyosavaş ve ülke güvenliği alanlarında biyolojik ve kimyasal etken maddelerin tespitinde benimsenmiştir. Son on yılda, biyosensörler üzerine araştırmalar hem bilimsel hem mühendislik gibi birçok disiplinde yoğun şekilde sürdürülmüştür. 40 yıllık bir gelişimden sonra, biyosensörler biyospesifik etkileşimleri izleme ve biyolojik ve kimyasal etken maddeleri tüm alanlarda tespit etme noktasında daha güçlü cihazlar ve enstrümanlar haline gelmiştir.

Biyosensör teknolojisi ve bunun ticari ürün uygulamalarıyla ilgili tanımlar, geçmişi ve gelişimi konularında detaylı bilgiler makale [8-16] ve kitaplarda [1,17-27] sunulmuştur.

2.3.4 Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyoalgılama teknolojileri, biyoalgılama materyalleri, transdüser cihazlar ve immobilizasyon metotları içermekte ve bunlar biyoloji, kimya ve mühendislik alanlarında çoklu disiplinler araştırmalar sonucu geliştirilmektedir. Bundan dolayı biyosensörler, gerek biyoalgılama materyalleri, gerekse uygulanan dönüştürme araçları temel alınarak çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir.

Biyoalgılama Materyalleri Temel Alınarak Yapılan Sınıflandırma

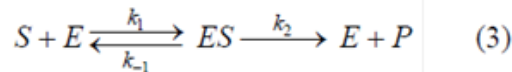
Biyosensörlerde kullanılan biyoalgılama materyalleri mekanizmalarına göre ilk olarak üç farklı gruba ayrılabilir: *biyokatalitik*, *biyoafinite* ve *mikrop esaslı* [12]. Biyokatalitik esaslı gruba, enzimler dâhildir; biyoafinite esaslı grup, antikorlar, algılayıcılar ve nükleik asitlerden oluşmakta; ve mikrop esaslı grup, mikroorganizmalar, hücreler, organeller ve dokulardan oluşmaktadır.

Enzim Sensörleri

Enzimler kimyasal dönüşümlerin modelini belirleyen moleküllerdir ve bunlar biyolojik sistemlerin katalizörleridir. Ayrıca enerjinin farklı şekillere dönüşümlerine aracılık ederler. Stryer'in [28] tanımladığı gibi, enzimlerin en önemli özelliği, reaksiyonları en azından bir milyonluk bir faktörle hızlandırmak için muazzam bir katalizör gücüne ve hem katalize edilen reaksiyonda hem de reaktan tercihlerine sahip olmalarıdır. Buna ilaveten, çoğu enzimin katalitik reaksiyonları düzenlidir.

Neredeyse bilinen tüm enzimler farklı kimyasal reaksiyonları yüksek derecede etkin şekilde katalize eden proteinlerdir. Enzimler reaksiyonları geçiş durumlarını stabilize ederek hızlandırır ve enzim-substrat bileşiği oluşumu enzimatik katalizde ilk adımdır.

Enzim kataliz mekanizması şu şekilde ifade edilebilir:



Burada S = substrat

E = enzim

ES = enzim-substrat bileşigi

P = ürün

k_1 = enzim-substrat bileşigi meydana gelme oranı

k_{-1} = enzim-substrat bileşigi ayrışım oranı

k_2 = enzim-substrat bileşiginin diğer ürünlere ayrışım oranı

Enzimler, biyosensörlerde en yaygın kullanılan biyoalgılama materyalleridir. Örneğin, glikoz ölçümü için biyosensörde kullanılan enzim, üzerinde en çok çalışma yapılan ve ticari olarak en fazla geliştirilendir. Glikoz oksidasyonuna oksijenle birlikte katılan orijinal form, glikoz oksidaz ile katalize olur ve glikonik asit ve hidrojen peroksiti ürün olarak verir (Denklem 1).

Doğada 2,500'den fazla enzim tespit edilmiştir ve bunların çoğu şu anda ticari olarak bulunabilmektedir. Biyosensörlerde kullanılan 20 farklı enzim arasından 3 tane önemli olanı, alkalen fosfataz (ALP), karaturp peroksidaz (HRP) ve *E. coli* β -D-galaktosidaz (BG)'dir.

Enzim biyosensörler için kullanılan immobilizasyon metotları iki ana grup altında sınıflandırılabilir: (1) Enzimlerin van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlama veya difüzyon bariyerleriyle adsorbsiyon veya fiziksel olarak tutulması; ve (2) enzimlerin, fonksiyonel protein gruplarının ve destek materyallerinin arasında gerçekleşen reaksiyon yoluyla transdüser kovalent bağlama yoluyla bağlanmasıdır [29]. Ancak, enzimler transdüserin yüzeyinde sabitlendiği zaman çoğunlukla aktivite kaybı yaşanır. Proteinler, sıcaklık, asitler, bazlar, organik solventler, deterjanlar, tuzlar ve diğer katalitik aktivitelerini zayıflatarak bilinen faktörlerden dolayı doğal yapıları bozulmuştur.

Enzim sensörlerinde, enzimler genel olarak amperometrik, potansiyometrik, kimyasal ışımaya ve termal transdüserlerle kullanılır. Örneğin, bir enzim esaslı manometrik biyosensör, süt üresini online ölçmek için tasarlandığında [30], bir amperometrik enzim biyosensörü gıdalardaki karbonhidratların tespitini sağlar [31], ve bir ISFET (İyon Seçici Alan Etkili Transistörler) tabanlı enzim biyosensörü patatesteki glikoalkaloidleri tespit etmek için kullanılır [32].

İmmuno Sensörler

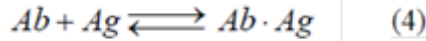
Antikorlar, önemli bir protein sınıfını temsil ederler. Bunlar yaklaşık toplam plazma proteinin %20'sini oluşturur ve genel olarak tüm memelilerdeki serum ve dokularında görülen glikoprotein grubu olan imünoglobülinler (Ig) olarak adlandırılırlar.

Bunlar belirli antijenlere reaksiyon olarak üretilir ve etkilere karşı toksinleri nötralize ederek, bakteri veya hücrelere yapışarak ve çözünabilir antijenleri çökeltmek hareketine geçerler. Antikorların humoral bağışıklıkla ilgili aracılık fonksiyonları iki ana grupta incelenebilir: (1) patojenler veya toksinlere bağlanan

belirli bir grup; ve (2) ev sahibi bünyenin bağışıklık sisteminin bileşenleriyle veya hücrel veya moleküler etkileşimler [33].

IgG, normal insan serumunda, toplam imünoglobulin havuzunun yaklaşık %70 ile 75'ine tekabül eden, etkili bir imünoglobülinidir. IgG, insanlarda plasentayı geçme kabiliyetine sahip tek imünoglobülinidir. IgG iç ve dış damar yollarında dengeli olarak dağılmış ve ikincil bağışıklık sisteminin ve seçkin antitoksin sınıfının temel antikordur. Kendi nispi bolluğu ve antijenlere karşı mükemmel özelliğiyle IgG, hem immuno sensörler hem de imünolojik araştırma ve teşhis ürünlerinde kullanılan temel antikordur.

Bir imünoglobülin'in temel dört zincirli yapısında, iki benzersiz hafif (L) polipeptit zinciri ve iki benzersiz ağır (H) polipeptit zinciri disülfide bağlarıyla bir birine bağlanmıştır. Antijenleri bağlayan alan, molekülün ucunda N-terminalindedir. Bu Y şekilli moleküllerin kolları, büyük oranda bir esnekliğe sahiptir ve bağımsız olarak faaliyet gösterebilirler. Antikor moleküllerindeki heterojenlik, isotipik (farklı ağır ve hafif zincir sınıfları ve alt-sınıfları), allotipik (çoğunlukla sabit bölgedeki varyasyon) veya idiotipik (sadece değişken bölgedeki varyasyon) varyasyonlara bağlıdır ve genetik olarak kontrol edilmektedir [34]. Antikorum ana fonksiyonu, antijeni bağlamaktır. Bunlar, doğrudan nötralize etme etkilerine ilave olarak, (örneğin bakteri toksini veya hücrelere viral sızıntı), çeşitli etkileyici fonksiyonlar yerine getirirler. Bunlar, içeri sızan antijeni (Ag) bağlayabilen ve zarardan koruyabilen antikorları (Ab) geliştiren organizmalardır.



Antikorlar, kendi substratlarını yapmak için özellikle ilgili antijene enzimlerden daha güçlü şekilde bağlanırlar. Aynı türün farklı cinslerine göre veya hatta aynı cinsin farklı serotiplerine göre çok özel durumları olabilir. Enzimlerin katalitik aktivitelerine sahip olmasalar da, son derece hassastırlar. Bir antikor, transdüser içindeki bir elektrotun veya bir optik dalga kılavuzunun yüzeyine analite bağlandıkları zaman tespit edilebilir sinyal sağlaması için doğrudan sabitlenebilir. Bu durumda, temel ya da yakalanmış antikorlar olarak adlandırılırlar.

Bunlar, radyoizotoplar, enzimler, kırmızı hücreler, ışınır proplar, kimyasal ışınır proplar, metal etiketler veya nanopartiküller gibi etiketler taşıdıkları zaman aynı zamanda etiketleme için de kullanılırlar. Daha sonra da ikincil veya tespit antikorları olarak adlandırılırlar.

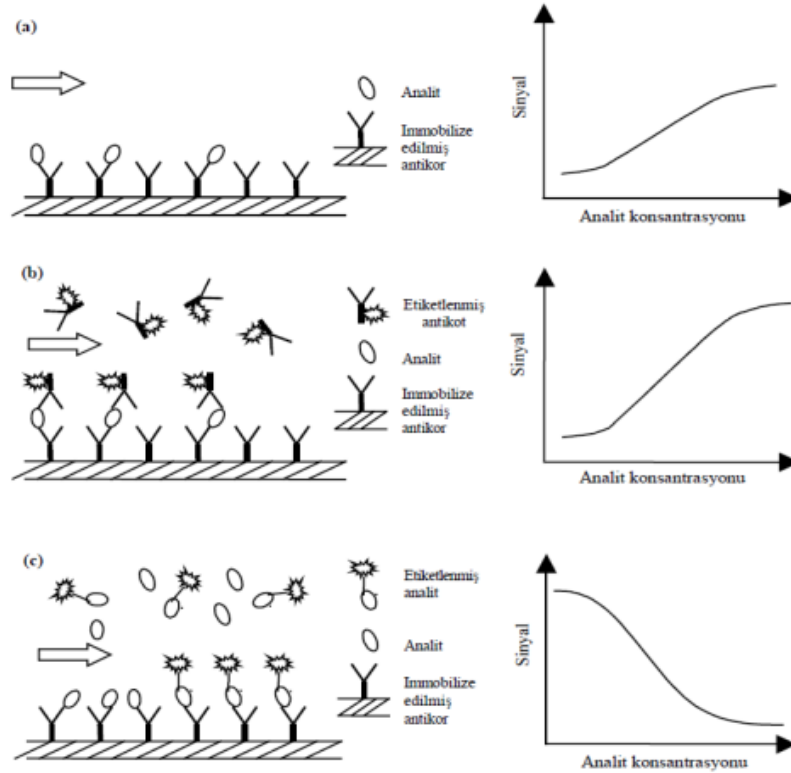
Immunoassay testleri ile çözültideki her iki tepkinin konsantrasyonunu ölçmek için antijen ve bir antikor arasındaki reaksiyonu temel alan teknikler olarak tanımlanabilir. Immunoassay testleri, homojen veya heterojen olabilir. Homojen bir sistem serbest ve bağlı antijenlerin ayırımına ihtiyaç duymaz ve sadece elektroaktivite değişiminde veya antikor-antijen bileşiğinin oluşumundaki etiket fonksiyonuna bağlıdır.

Daha hassas bir yaklaşım, içerisinde ayrılma adımının bulunduğu heterojen deney formatıdır.

Şekil 3'te gösterildiği gibi, bağışıklık deneylerinin üç temel formatı vardır. Bunlar aynı zamanda immuno sensörlerin tasarımında kullanılır:

1. *Doğrudan immunoassay testi*: burada antikorlar (veya antijenler) bir transdüser yüzeyinde sabitlenmişlerdir ve örnekteki analit, sabitlenmiş antikorlara bağlanır;
2. *Sandviç immunoassay testi*: burada antikorlar transdüser yüzeyde sabitlenmişlerdir. Örnekteki analit, sabitlenmiş antikorlara bağlanır (temel veya yakalanmış antikorlar) ve sonra etiketlenmiş ikincil antikor (veya tespit antikorları) analite bağlanır; ve
3. *Kompetitif immunoassay testi*: burada antikorlar transdüser yüzeyinde sabitlenmiştir ve örnekteki analit ve etiketli analit benzer şekilde sabit antikorları bağlarlar.

Cevap sinyali, doğrudan ve sandviç formatlarda artar, ancak analit konsantrasyonu arttığından kompetitif formatında azalır. Immunoassay testlerinin sandviç formatı, sadece makro-moleküler antijenler için sandviç formunu oluştururken ihtiyaç duyulan iki bağlanma işlemi için en az iki epitop için kullanılabilir.



Şekil 3. Farklı formatlar ve immunoassay testlerinin ilişkili cevap sinyalleri: (a) doğrudan test, (b) sandviç testi, ve (c) kompetitif test.

Biyosensörlerdeki hem birincil, hem de ikincil antikorlar genel olarak elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik transdüserler aracılığı ile birleşirler. Sığır sütlerindeki progesteronun online ölçümünü yapmak için geliştirilmiş antikor esaslı optik biyosensör [35, 36], gıda numunelerinde *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella typhimurium*'un hızlı tespiti için üzerinde çalışılmış etiketsiz QCM imüno sensör [37], ve sudaki antibiyotik ve pestisit kalıntılarını tespit için sunulmuş bir optik imüno sensör [38] örnekler arasında sayılabilir.

Nükleik Asit Prob Sensörleri

Tüm nükleik asitler (DNA veya RNA) şeker veya şekerin bir türevinden, fosforik asit ve bazdan oluşmakta ve hücre çekirdeğinde bulunmaktadır. Nükleotid/nükleosid ailesi iki ana kola sahiptir. Bunlar: şeker riboz ve 2- deoksiriboz türevleri. Mono-nükleotidlerin her iki kolu da fosfat asit guruplarına bağlı olarak 1 ve 6 arasında pKa değerlerine sahip güçlü asitlerdir. Mono, bi ve tri fosfatların hepsi ortaya çıkabilir. Özellikle, baz adenzin (AMP, ADP ve ATP) türevleri fosfat taşıyan etken maddeler olarak önemlidir. Tri ve bi fosfatlar ayrıca özel inşa blokları için kovalent bağlayıcı taşıyıcı fonksiyonunu yerine getirmektedir [18]. Tek dizilimli nükleik asit molekülü, örnekteki kendi tamamlayıcı partnerini tanıma ve ona bağlanma (hibridize) kabiliyetine sahiptir ki bu özellik bir biyosensörde gen proplarında kullanılabilir. Bundan dolayı, bir nükleik asit probu, nükleik asidin özellikle tanımlayan ve iki nükleik asit dizisinin arasındaki kararlı hidrojen bağlarının oluşumuna bağlı olarak hedef nükleik asit bağlayan bir alt bölümüdür. DNA proplarının uzunluğu onlarcasından birkaç binlercesine kadar nükleotidin sürebilir, ama genellikle DNA prob tasarımlarında 30 nükleotid kullanılmaktadır [39].

Son zamanlarda, *aptamerler*, yani diziliş havuzlarından rastgele seçilen belirli nükleik asitler biyosensörlerde biyoalgılama materyali olarak kullanılmıştır. Aptamerler, yüksek afinitiyeye sahip küçük moleküller ve proteinler gibi nükleik olmayan asit hedeflerini bağlama kabiliyetine sahiptir [40]. Aptamerler ayrıca toksinler veya prionlar gibi hedef haptenlere karşı seçilebilmektedirler. Aptamerler artık, biyosensörlerin geliştirilmesinde moleküler olarak tanımlanmış olarak, antikorlar veya diğer biyomimetik algılayıcılara yönelik geçerli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.

Nükleik asit probları, bir bireyin genetik yapısının araştırılmasında ve genlerin veya genetik hastalıklarla bağdaştırılan mutant genlerin görünümünün sunulmasında kullanılmaktadır. Bunlar ayrıca, su, gıdalar, bitkiler veya hayvanlardan gelen örneklerdeki patojenik bakteri veya virüslerin tespitinde kullanılabilirler.

Örneklerin nükleik asit alma işlemi ve nükleik asit diziliş yükseltmesi için işleme tabi tutulması önemlidir. Hücreleri parçalayıp çözmek, proteinlerin yapısını değiştirmek ve aynı zamanda çift dizilişli nükleik asitleri tek dizilişli hedef DNAlar haline getirip hibritizasyon için hazır hale getirmek için deterjanlar ve NaOH

kullanılır. Teorik olarak, DNA problemleri nükleik asitleri pikogram seviyesinde tespit edilebilir. Ancak, gıda ve çevrede patojenlerin tespiti gibi çoğu uygulamada bu yeterince hassas değildir. Bu yüzden, hedef nükleik asitlerin tespit edilebilir seviyeye ulaşabilmeleri için yükseltmeleri gerekmektedir. Doğal olarak yükseltilmiş bir hedefin tespit edilebilmesi için bir yol, ribosomal RNA hedef molekülleridir [41] ve diğer bir yol ise PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yükseltme metodudur [42].

Genellikle, ya hedefler ya da problemler transdüserin yüzeyinde nitroselüloz, naylon, polivinilinden difluorid ya da aminolu sentez oligonükleotidler, thil veya bitin gruplarıyla sabitlenir ve sonra kontrollü ortamda problemler veya hedefler hibridize edilir. DNA probu enzim, ışığa veya bir hapten ile etiketlenebilir. Bir DNA prob biyosensörü, 1 pg kadar küçük hedef DNA'yı tespit edebilir.

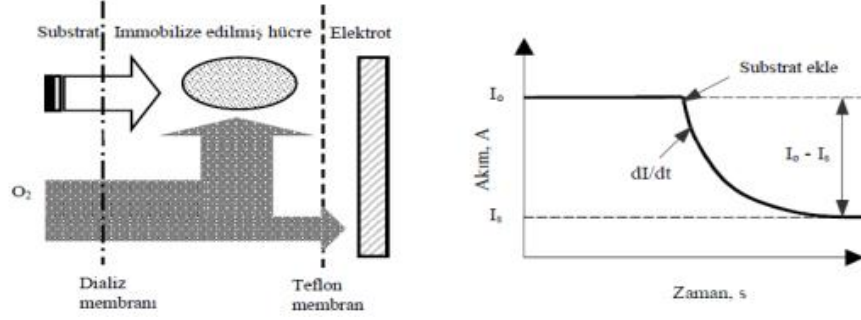
DNA, RNA ve aptamer problemleri, biyosensörlerde tipik olarak elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve manyetik transdüserler ile bağdaştırılır. Örneğin, aptamerler ışığa ile etiketlenir ve çip esaslı biyosensörde karmaşık biyolojik karışımlar içindeki bağımsız proteinlerin eş zamanlı tespit edildiği ve miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır [43]. Nanopartikül esaslı DNA biyosensörünün temel transgenik ekinlerde genetik olarak değişikliğe uğratılmış organizmaların görsel tespitinde kullanıldığı rapor edilmiştir [44]. Ayrıca bir mikro sistemtabanlı DNA prob biyosensörünün canlı *E. coli*'nin gıda ve suda izlenmesi ve tespiti için geliştirilmiştir [45].

Mikrop Esaslı veya Hücre Esaslı Sensörler

Mikroorganizmalar, kimyasal bileşik ve diğer canlıların tespit edicileri olarak kullanılır. İlk mikrobiyal biyosensör, Davis [46] tarafından etanol *Acetobacter xylynum* hücrelerini kullanarak etanolün tespiti için geliştirilmiştir. Bir mikrobiyal biyosensör, solunum temelli transdüser ile bağlantılı sabitlenmiş canlı mikrobiyal hücreler ve hücrelerin metabolik fonksiyonlarını içermektedir. Takip edilmek istenen analit, bu süreçte ya substrat ya da bir inhibitor olabilir. Bundan dolayı, mikrobiyal biyosensörler, algılama ve solunum aktivitesi veya elektrokimyasal aktif metabolitler olarak sınıflandırılır [47].

Şekil 4, hücre esaslı biyosensörlerin solunum aktivite tipi prensibini göstermektedir. Mikroorganizmalarda sindirimden kaynaklanan solunum aktivitesindeki değişiklikler bir oksijen elektrotu ile tespit edilir ve sonra bu değişikliklerden substrat konsantrasyonu akım ölçümü ($I_o - I_s$) temel alınarak tahmin edilebilir. Bu tip biyosensörlerde aerobik mikroorganizmalar kullanılır. Mikrobiyal biyosensör, oksijenle doyurulmuş bir tampon çözeltiye daldırılır. Substratın eklenmesinden sonra, mikroorganizmaların solunum aktivitesi artar, bu da membranın çevresindeki oksijen konsantrasyonunda azalmaya yol açar. Mikrobiyal biyosensörlerin elektrokimyasal olarak aktif olan metabolit tipleri, H_2 , CO_2 , NH_3 ve organik asitler gibi mikroorganizmalardan salgılanmış elektrokimyasal olarak aktif olan metabolitleri tespit eder. Sadece aerobik olanlarla sınırlı olmamak kaydıyla, bu

tip hücre esaslı biyosensör anaerobik mikroorganizmaları kullanabilir. Biyolojik ışınır tabanlı mikrobiyal biyosensörler, genetik olarak inşa edilmiş, *lux* geninin toksisite ve biyoyararlanım testi için bir uyarılabilir gen destekçisi ile kaynaşmasıyla geliştirilebilir [48].



Şekil 4. Hücre esaslı biyosensörlerin solunum aktivitesi tiplerinin prensipleri. (Sol) Biyoalgılama kavramının şematik çizimi ve (sağ) akım ölçümündeki değişiklik; burada ilk akım I_0 ve substratın eklenmesinden sonraki akım I_s .

Mikroplar veya canlı hücreler genelde amperometrik, potansiyometrik veya impedans transdüser ile hücre esaslı biyosensör oluşturmak için kullanılır. Hücre esaslı biyosensörler genelde gıda güvenliğinde patojenlerin ve toksinlerin çevresel izleme ve tespitinde BOD ölçümü için geliştirilmişlerdir. Örneğin, bir mikrobiyal yakıt hücresi tabanlı biyosensör BOD'un sürekli tespiti [49] için kullanılmıştı, cam bir mikroçip ve kültürlenmiş hücre esaslı biyosensör üzerinde lipopolisakkarit [50] tespiti ve metil parathion pestisit tespiti için *Flavobacterium* sp. tam hücreleri cam fiber filtreler üzerinde kullanan optik mikrobiyal biyosensör [51] için çalışıldı. Çeşitli değerlendirme makaleleri tam-hücre esaslı biyosensörler ve bunların hücre biyolojisi, toksikoloji, farmakoloji ve çevresel ölçümler içerisinde potansiyel uygulamalarını incelemiştir [52–54].

Doku Esaslı ve Organel Esaslı Sensörler

Bitki ve hayvan kaynaklarından alınan doku materyalleri, biyosensörlerde biyoalgılama materyalleri olarak kullanılmaktadır. İlk doku esaslı sensör, Rechnitz [55] tarafından arginin tespitinde kullanılmıştır. İnce bir dilim sığır karaciğeri ve enzim ürazin bir bölütünü kullanmıştır. Membranlar, solunum zinciri, kloroplastlar, mitokondri ve mikrosomlar gibi temel hücre fonksiyonlarını sürdüren alt hücrel organeller bazı biyosensörlerde belirli analitlerin tespitinde kullanılmıştır. Doku-veya organel-esaslı biyosensörler, enzim biyosensörlere kıyasla daha yüksek seviyede kararlılık gösterme kabiliyetine sahiptir. Ancak genellikle daha uzun tespit süresine ihtiyaç duymaktadır ve üstelik daha fazla belirginliğe sahip değildir. Enzim inhibitörleri, aktivatörler ve kararlı hale getiren etken maddeler, seçiciliği geliştirmek, doku ve organel esaslı biyosensörlerin ömrünü uzatmak için kullanılmaktadır.

Wijesuriya ve Rechnitz [56], ilaçlar, hormonlar, toksikantlar, nöroiletkenler ve amino asitler gibi çeşitli önemli analitler için bitki ve hayvansal dokular esaslı biyosensörlerin kapsamlı bir değerlendirmesini sunmuşlardır. Hayvanlardan ve bitkilerden alınan algılayıcılar, biyosensörler için, ISFET'ler (iyonseçici alan etkili transistörler), elektrik kapasitörleri ve optik fiberler gibi transdüserlerin üzerinde, kısa yanıt süresi, yüksek hassasiyet, geniş aralıkta doğrusal yanıt ve doğal seçicilik elde etmek için sabitlenmiştir. Son raporlarda, örneğin, *Malva vulgaris* doku homogenate, biyoalgılama materyali olarak bir enzim içinde amperometrik biyosensörde gıda örneklerinde sülfite tespiti için kullanılmıştır [57]; bir kimyasal ışımaya biyosensöründe laktik asit tespiti için [58] domuz böbreği kullanılmıştır; ve fenolik bileşiklerini tespit etmek için bir ampermetrik biyosensör elektrotu üzerinde mantar doku homogenate sabitlenmiştir [59].

Sınıflandırma Tabanlı Dönüştürme Metotları

Biyolojik materyalleri ve dönüştürme araçları arasındaki ara birim formatları tabanında, biyosensörler, iki genel kategoriye ayrılabilir:

- Doğrudan biyosensörler* (veya *label free biyosensörler*), içinde fiziksel ve kimyasal sinyaller doğrudan analitin varlığını ve miktarını göstermektedir (örneğin, glikoz, bakteri, ammonia), çevrecilerden herhangi birini kullanarak, enzim elektrotlarının birçoğu, impedans, optik fiber, yüzey plazmon rezonans (SPR), yüzey akustik dalga kılavuzu (SAW) veya QCM transdüserler.
- Dolaylı biyosensörler* (veya *etiketli biyosensörler*), içinde analitlerin varlığının sebep olduğu kimyasal reaksiyon etiketler vasıtasıyla tespit edilebilir (örneğin enzimler, ışımaya, metal partiküller) bunlar da çeşitli elektrokimyasal, impedans, optik, alan etkili transistor (FET), QCM, kalorimetrik ve manyetik transdüserler gibi transdüserleri kullanarak biyokimyasal sinyalleri yükseltmektedir. Bariz şekilde, aynı biyosensör ya doğrudan ya da dolaylı olarak farklı uygulamalarda kullanılabilir. Kullanılan farklı dönüştürme araçları bazında, biyosensörleri elektrokimyasal, optik, pizelektrik, termal ve manyetik biyosensörler olarak sınıflandırabiliriz.

Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, diğer tiplerle kıyaslandığında en eski ve en gelişmiş biyosensörlerdir. Erken dönemlerde, genellikle biyosensörler özellikle klinik glikoz analizi için geliştirilen enzim elektrotları şeklindeydi. Sonra, enzim-bağılantılı immünoelektrokimyasal (IEC, Immunochemical) deney Heinemann ve meslektaşları tarafından elektrokimyasal biyosensörlerin hassasiyetini artırmak için geliştirildi [60]. Bir tamponun elektriksel özelliklerinin etkisi (enzimatik reaksiyon tarafından veya Ab-Ag etkileşimince sebep olunan) çeşitli elektrokimyasal metotlarla ölçülebilir. Elektrokimyasal biyosensörler üzerine son araştırmalar elektrot tasarımlarının geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır (örneğin küçültme, etkin

elektron transferi, nanomateryaller ve daha iyi sabitleme prosedürleri). Elektrokimyasal biyosensörler sonra amperometrik/voltmetrik, potansiyometrik ve iletkenlik/kapasitans/impedans biyosensörler olarak ayrılabilir. Bunların hepsi ileride değerlendirilecektir.

Amperometrik/Voltmetrik Biyosensörler: Amperometrik ve voltmetrik biyosensörler elektro kimyasal sistem ile kendi akım potansiyel ilişkilerine göre sınıflandırılabilir. Amperometrik sensörler, voltmetrik sensörlerin bir alt grubu olarak görülebilir. Amperometrik sensörlerde, elektrokimyasal hücrelere sabit bir potansiyel uygulanmaktadır ve sonra ilişkili akım bir indirgenme veya oksidasyon reaksiyonuna bağlı olarak elde edilir.

Ancak, bir voltmetrik sensör, örneğin doğrusal veya döngüsel voltmetrik diğer modlarda çalışabilir. Bunun sonucunda, her mod için ilgili akım ve gerilim farklı olacaktır.

Genellikle, amperometrik biyosensörler konsantrasyon bağımlı akımı biyolojik olarak aktif materyalle kaplı elektrokimyasal elektrot aracılığıyla ölçerler. Amperometrik dönüştürme, oksidasyon ve elektro aktif türlerin bir elektrot yüzeyinde indirgenmesi üzerine temellenmiştir. Elektriksel akım ve analit konsantrasyonu arasındaki ilişki Cottrell denklemi ile ifade edilebilir:

$$i = n F A C_0 [D/(\pi t)]^{1/2} \quad (5)$$

Burada i = ölçülecek akım

n = transfer olan elektron sayısı

F = Faraday sabiti, eşitlik başına 96 487 C

A = elektrot alanı

C_0 = analit konsantrasyonu

D = difüzyon sabiti

t = potansiyel uygulandıktan sonra geçen süre

Elektron dönüştürmesi için şimdiye kadar birçok çalışma yapılmıştır. Dördüncü nesil amperometrik biyosensörlerde, elektrot yüzeyinde oksidasyon ve indirgeme ile biyolojik reaksiyonları geliştirilmiş; elektronları, substratı indirgedikten veya oksitledikten sonra enzimden elektrotta aracı moleküller kullanarak transfer edilmiş; elektrot yüzeyini molekülleri ekledikten sonra, doğrudan enzimin elektrotta oksidasyonuna veya reaksiyonu sağlanmış; ve elektrotu kendi boyutunda mikro veya nanometre haline getirilerek veya birbirine geçmiş dizilişli mikro elektrotları kullanarak nanotüpler/ nanokablolar/ nanofiberler uygulanmıştır.

Amperometrik bir transdüser, her hangi bir enzim, antikor, DNA probu, tam hücreler ve dokular da dâhil biyoalgılama materyali ile birlikte kullanılabilir. Örneğin, bir redoks hidrojel esaslı amperometrik bienzim biyosensörler balık tazeliğinin izlenmesi amacıyla yapılmışlardır [61], imünomanyetik ayırıştırma ile bir arada kullanılan bir bienzim elektrokimyasal biyosensör gıda örneklerinde

Escherichia coli O157:H7'nin hızlı tespiti için geliştirilmiştir [62], ve karbon nanotüpleri üzerinde kendi kendini oluşturan asetil kolinesteraz temelli bir biyosensör organofosfat pestisitlerin akış enjeksiyon/amperometrik tespiti için ortaya konmuştur [63].

Potensiyometrik Biyosensörler: Potensiyometrik ölçümler net akım akışı olmayan faradik olmayan bir elektrot sürecinden oluşur ve elektrot üzerinde önemli miktarda gerilim oluşumu ile sonuçlanan bir elektrot yüzeyinde yük yoğunluğu birikimi prensibi üzerine çalışır. Potensiyometrik biyosensörler, uygun biyoreseptörler ve uyumlu transdüserler kullanarak, bir iyonun iyonofora bağlanmasından kaynaklanan elektriksel gerilimdeki değişiklikleri takip eder. Potensiyometrik tespit, biyolojik algılama elementi içeren bir elektrokimyasal hücre içerisinde genellikle ya bir ürünün aktivitesi ya da elektrokimyasal reaksiyondaki bir tepkenin aktivitesinin gerilimini ölçer. Ölçülen gerilim Nernst denklemi ile verilir:

$$E = E_0 + [RT/(nF)] \ln a \quad (6)$$

Burada $E = V$ birimi ile ölçülen gerilim

$E_0 = a = 1 \text{ mol l}^{-1}$ için standart gerilim

$R =$ gaz sabiti

$T = K$ biriminde sıcaklık

$F =$ Faraday sabiti

$n =$ elektron transfer sayısı

$a =$ ilgili iyonun nispi aktivitesi

İçerisinde enzimlerin analiz amaçları dâhilinde potensiyometrik elektrotları ile birlikte kullanılabileceği çeşitli konfigürasyonlar mevcuttur. Alan etkili transistör (FET, Field Effect Transistor), Bergveld [64] tarafından önerilmiş ve etiketsiz bağı gerçekleştirmek için son derece uygundur. FETlerin küçük boyutları ve aynı zamanda bütünleşik impedans dönüşümü son derece istenen özellikleridir. Biyoalgılama amacıyla kullanılan dört tip FET bulunmaktadır [18]:

- *İyon seçici alan etkili transistörler (ISFETs, Ion Selective Field Effect Transistors)*, çözeltideki iyonlara cevap verir;
- *Enzim alan etkili transistörler (ENFETs, Enzyme Field Effect Transistors)*, içerisinde enzim substratlarını veya bir enzim reaksiyonu ile birleşen türleri ölçmek için sabit enzimler kullanılmaktadır;
- *İmüno alan etkili transistörler (IMFETs, Immuno Field Effect Transistors)*, antikör antijen etkileşimi ile yük ayrımı meydana getirir ve
- *Kapatılmış geçiş alan etkili transistörler (SGFETs, Suspended Gate Field Effect Transistors)*, çalışma fonksiyonundaki değişikliklere göre temellenmişlerdir ve biyoalgılama materyalinin çeşitli gazlarla etkileşimleri sonucu dipol merkezlidirler.

Bazı durumlarda, örnekte (sadece enzim tarafından üretilen maddeyi tespit etmek ister) hali hazırda bulunan amonyak veya karbondioksit tarafından yapılabilecek engellemeleri önlemek için, bu türlerde ENFET, bir ISFET ile eşlik eder, ikincinin sinyali ilkinden çıkarılır.

Diğer bir potensiyometrik biyosensörler grubu ışıkla yön gösterilebilir potensiyometrik sensörü (LAPS, Light Addressable Potentiometric Sensor) temel almış bunlar da nispeten daha büyük partikülleri [65,66] tespit edebilmektedir. Her iki FET ve LAPS transdüserleri, potensiyometrik biyosensör olabilmeleri için biyoalgılama materyallerinin her hangi biri ile birleştirilebilirler. Son zamanlarda, örneğin, bir LAPS biyosensörü streptavidin-kaplı manyetik tanecikleri ile birlikte gıdalarda E. coli O157:H7 tespitinde [67] kullanılmıştır, bir anyon seçici LAPS, iyonlarda nitrat ve sülfat iyonlarının [68] tespitinde kullanıldığı rapor edilmiş, ve bir enzim- potensiyometrik biyosensör gıda bitkilerinde doğrudan siyanitlerin tespiti için [69] geliştirilmiştir. Amperometrik ve potensiyometrik biyosensörlerde ilgili daha fazla bilgi çeşitli derleme makalelerinde mevcuttur [70-72].

İletkenlik/Kapasitans/İmpedans Biyosensörler: İletkenlik, kapasitans ve impedans biyosensörleri elektriksel alandaki farklı değişiklikleri ölçerler. Bu değişiklikler çözeltinin veya aracı maddenin genel elektriksel iletkenliği ve elektrot yüzey üzerindeki sabitlenmiş tabakaya bağlı olan ve aynı zamanda impedimetrik reaksiyon gösterebilme ile yansıtılabilen kapasite değişimi olabilir. Erken dönem iletkenlik/impedans biyosensörleri, hedef analitlerce sebep olunan, araçlar üzerindeki iletkenlik değişikliklerini temel almışlardı. Ancak, çözeltinin direnci var olan tüm iyonların göçü ile belirlenir ve iletkenlik ölçümlerinin genellikle nispeten belirsiz oldukları düşünülür.

Bu problem, düzlemsel mikroelektronik iletken hücreler içinde veya üzerinde sabitlenmiş enzimlerin katalitik aksiyonları sonucu oluşan iletkenlikteki değişikliklerin izlenmesi ile çözülebilir [73]. Çoğu enzim reaksiyonları katalize eder ve bu da çözeltinin iletkenliğinde genel değişikliklere sebep olur ve böylece iletkenlik ölçen biyosensörlerde algılama elementleri olarak büyük bir potansiyel sergilerler.

İletkenlik ve kapasitans biyosensörleri, impedans biyosensörlerinin gerçekten basit versiyonlarıdır. İmpedans ve direnç, kapasitans ve indüktans arasındaki ilişki şu şekilde ifade edilebilir:

$$Z = R + jX = R + j(X_L - X_C) \quad (7)$$

Burada Z = impedans, kompleks sayı

R = direnç

X = reaktans

X_C = kapasitif reaktans = $(2\pi f C)^{-1}$, ki burada f = frekans ve C = kapasitans

X_L = indüktif reaktans

j = imajiner birim

Genellikle indüktans, bir elektrokimyasal sistem analizinde ihmal edildiğinden, Denklem 7'deki impedans sadece direnç R'yi ve kapasitif reaktans X_C 'yi içermektedir. İmpedans mikrobiyoloji'sinden dolayı, impedans biyosensörleri uygulama yollarını daha çok patojenik bakteri, özellikle canlı bakteri tespiti yolunda bulmuşlardır. İmpedans biyosensörlerinin çeşitli tipleri mikroakışkanlar ve birbirine geçmiş diziliş mikroeletrotları ile birlikte, *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 [74-77]'nin hızlı tespiti için tasarlanmışlardır. Çeşitli tek kullanımlık analit-özel sensör modülleri içeren taşınabilir bir impedans tabanlı bir biyosensör, Louie ve meslektaşları tarafından [78] saha kullanımı için geliştirilmiştir. Bir kapasitif alan etkili biyosensör ve bir iletken tyrosinase biyosensör pestisit kalıntılarının tespit edilmesi amacıyla yapıldıkları bildirilmiştir [79,80]. Empedans biyosensörleri hakkında ek bilgi için bazı derleme makaleleri bulunmaktadır [81,82].

Optik Biyosensörler

Optik metotlar, biyolojik ve kimyasal analitlerin algılama teknikleri arasında en eski ve en oturmuş teknikler arasındadır. Biyosensörlerin üretiminde çeşitli optik teknikleri kullanılmıştır. Tipik bir optik biyosensör bir ışık kaynağından, belirli özelliklerde ışık demeti oluşturmak için bir urup optik bileşen ve bu ışığı yönlendirme ve değiştirme etkeni, bir dönüştürülmüş algılama başı (boyalar ve proteinler ve fonksiyonel kimyasal gruplarla dönüştürülmüş, optik fiber veya antikorlarla kaplanmış kristaller) ve bir ışık dedektörü. Daha önceki değerlendirmelerimize benzer şekilde, iki tip optik biyosensör formatı vardır:

Hedef analitin doğrudan ve dolaylı tespiti. Doğrudan formatta, analit, dalga kılavuzunun optik özelliklerini doğrudan etkiler; örneğin gözden çabuk kaybolan dalgalar (ışık içerisinden yansıtıldığı zaman, optik dalga kılavuzu dışında, aracı içinde üretilen elektromanyetik dalgalar) veya yüzey plazmon titreşimi (dalga kılavuzu yüzeyine yerleştirilmiş ince bir filmde çabuk kaybolan bir dalga). Doğrudan formatta, ışıma, metal partiküller veya nanopartiküller gibi optik etiketler, hedef analite oranla optik sinyaller üretmek için kullanılır. Optik biyosensörler, yüzeye tutunma, ışıma, fosforesan ışıma, polarizasyon, rotasyon, müdahale veya harmonik üretim gibi doğrusal olmayan konular da dâhil optik olgular temelinde tasarlanabilir [12, 83]. Yüzey tutunma ve yansıma, ışıma, SPR, optik fiber, ve benzerleri de dâhil çeşitli tiplerdeki optik biyosensörler aşağıda özetlenmiştir.

Emilim ve Yansıtma Biyosensörleri: Emilimdeki optik yanıt verme, Lambert Beer Kanunu (Denklem 8) temel almıştır ve bu da düzenli bir aracı birim tarafından yayılan ışının yoğunluğunu optik özellikler kimyasal konsantrasyondan etkilendiklerinde bir ani ışık fonksiyonu olarak sınıflandırır. Emilim A, şu şekilde ifade edilir:

$$A = -\log(I/I_0) = \epsilon C l \quad (8)$$

Burada, I = iletilen ışığın yoğunluğu

I_o = anlık ışığın yoğunluğu

ϵ = $M^{-1} cm^{-1}$ içindeki katsayının ortadan kalması

C = M içindeki analit konsantrasyonu

l = cm biriminde aracı içinden geçen ışığın yol boyu

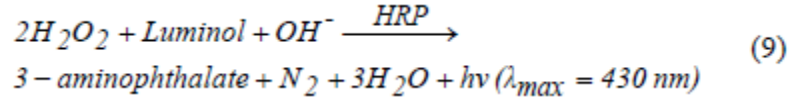
Dalgaboyu aralıklarında bir ışık spektrumu emilir bu da her bir kimyasal türe göre değişir. Belirli kimyasal türler için ışık yoğunluğu sinyali genellikle, sadece zeminde ölçülen bir referans bir sinyalle karşılaştırılır. Emilim ölçümü, içinde enzim etiketlerinin aracının optik emilimini değiştirmek için substratla reaksiyona girmek için kullanılan sandviç formatındaki biyosensörce uygulanır. Ancak, emilim sensörleri ışık saçılımından, dış ışık kaynaklarından, örnek odası yüzeyindeki iç yansımalarından ve ışık nüfuz limitinden bozulabilir. Bunlar, aracının yüzeyinden veya daha derin katmanlarından geri yansıyan ışığın ölçülmesiyle çözülebilir. Yansıtılan ışığın yoğunluğundaki değişim, hedef analitle bağdaştırılan fiziksel veya kimyasal olayla orantılıdır. Çoğu uygulamada, emilim ve yansıma metotları, daha ilerde göreceğimiz optik fiber, ışınır kılcal dolmuş cihazlar (FCFD, Fluorescent Capillary Fill Devices), ışıma veya toplam dahili yansıma ışıma (TIRF, Total Internal Reflection Fluorescence) ile birleştirilir.

Emilim/yansıma transdüserleri, biyosensörlerde enzimler, antikorlar ve DNA/RNA propları ile birlikte kullanılırlar. Son zamanlarda, enzim bağışıklık deneyi tabanlı bir emilim biyosensörü ette ve süt ürünlerinde penisilin kalıntıları tespiti için geliştirilmiş [84]; bir emilim biyosensörü, imüno-manyetik ayırıştırma ile birleştirilerek gıdalarda Escherichia coli O157:H7 tespitinde [85] kullanılmış; ve tek kullanımlık bir alıcı-tabanlı emilim biyosensörünün su örneklerindeki nitrat tespitinde kullanıldığı rapor edilmiştir [86].

Işınım Biyosensörleri: Işıma, moleküllerin uyarıldıktan sonra temel durumlarına geri dönerlerken ışın yaydıkları zaman doğan durumdur. Kimyasal ışıma ve biyolojik ışıma, biyosensörlerde ve hücre-tabanlı biyosensörlerde enzim, antikor, DNA propu gibi çeşitli şekillerde kullanılmışlardır. Kimyasal ışımanın ışık emisyonu, kimyasal reaksiyon ile belirlenirken, biyolojik ışımanın ki canlı organizmaların (bakteri, balık, haşaratlar ve mantarlar) enzimlerle katalize edilen reaksiyonlarıyla belirlenir. Işınım biyosensöründe, sabitlenmiş biyoalgılama materyallerine sahip bir algılama tabakası, örnekteki belirli hedef analiti tespit edebilmektedir. Işık yayılımı başladıktan sonra, ışık dalga kılavuzu ile ışık dedektörüne gönderilir.

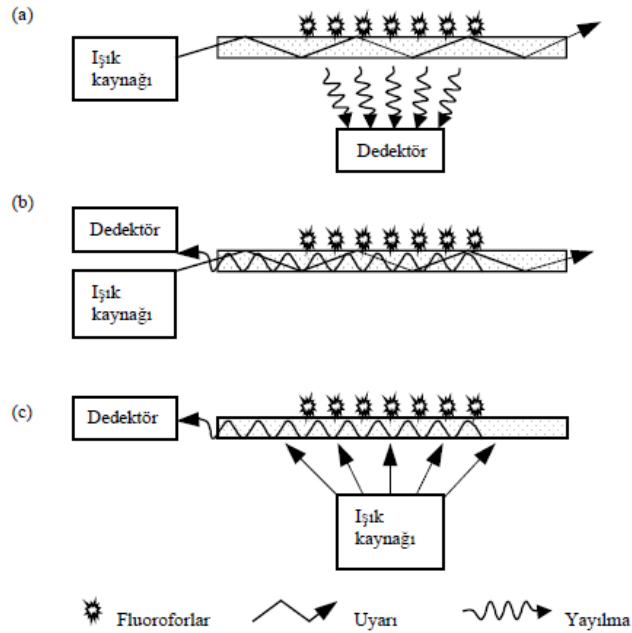
Işıldayan enzimatik bir sensör, genellikle hassas bir şekilde ATP, NAD(P)H veya H_2O_2 ve ışıldayan sistemlerle düzen içinde çalışan yardımcı enzimler de dahil daha karmaşık sistemlerle tespit edilebilir [87]. Örneğin, H_2O_2 'yi tespit etmek için, kimyasal ışınımlı bileşikler çoğunlukla luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4

phthalazinedione) ve ilgili hidrazid'leri kullanırlar. Luminol aracılı, karaturp peroksidaz (HRP, EC 1.11.1.7) varlığında kimyasal ışıma, hidrojen peroksiti aşığıdaki gibi tespit edebilir:



H_2O_2 ölçümü, algılama membranında 10^{-8} M limit tespiti ile peroksidaz kullanılarak bir dakikada yapılabilir ve benzer şekilde limit tespiti ATP ve NADH için sırasıyla 10^{-11} ve 10^{-9} M olabilir [88]. Kimyasal ışınım sinyalleri çok hızlı bozulduğundan, substratın hızla kimyasal ışınım ayıraçla karıştırılması ve ışık dedektörünün sinyali kaydetmesi için uygun bir band genişliğinin olması gerekmektedir.

Genellikle ışınım biyosensörler; enzimler, antikorlar, canlı mikroplar, kırmızı hücreler veya bunlardan herhangi ikisinin kombinasyonunun biyoalgılama materyalleri olarak kullanılmasıyla tasarlanır. Bunlar, pestisitlerin, patojenlerin ve gıda bileşenlerinin tespitinde kullanılırlar. Örneğin, bir biyolojik ışıma ve hücre-tabanlı sensör, su örneklerinde hidrojen peroksitin toksisitlerinin, fenol ve mitomisin C [89] tespitinde kullanılmışlardır; bir imünomanyetik kimyasal ışıma fiber optik biyosensörü, kıyılmış sığır etinde, tavuk karkasında ve marul örneklerinde E. coli O157:H7'in tespitinde kullanılmış [90]; ve bir ATP biyolojik ışıma biyosensör, biyoenerjistik olarak gıdalarda canlı patojenlerin varlığını onaylamıştır [91].



Şekil 5. Gözden çabuk kaybolan dalga kullanan ışınır biyosensörlerin üç farklı formatı: (a) dalga kılavuzu ile uyarılma, (b) dalga kılavuzu ile uyarılma ve yayılma ve (c) dalga kılavuzu ile yayılımın toplanması.

Işıma Biyosensörler: Işıma; ışınır boyalar, fluoroforlar ve fluorokromlar gibi belirli moleküllerde dış ışık kaynağı uygulandığı zaman ortaya çıkar.

Yayılmı sinyali, uyarma ışığına göre tipik olarak daha zayıftır ve daha uzun dalga boyuna sahiptir. Işıma reaksiyonu veya yayılma, ışık kaynağıyla veya yarılmı ile aniden ortaya çıkar. Çoğu ışıma biyosensörlerde, biyoalgılama materyallerinin çabuk kaybolan dalga ile yüzeyde birleşerek özellik verir. Liley [83] tarafından tanımladığı üzere, yüzey-bağlantı ışınır etiketlerin tespitinde çabuk kaybolan dalga kullanımının temel olarak üç farklı formatı vardır: çabuk kaybolan dalga kullanarak fluoroforu uyarır (Şekil 5a), fluoroforu uyarma ve dalga kılavuzundan yayılan ışınları toplama (Şekil 5b), ve optik dalga kılavuzundan yayılan ışını toplama (Şekil 5c).

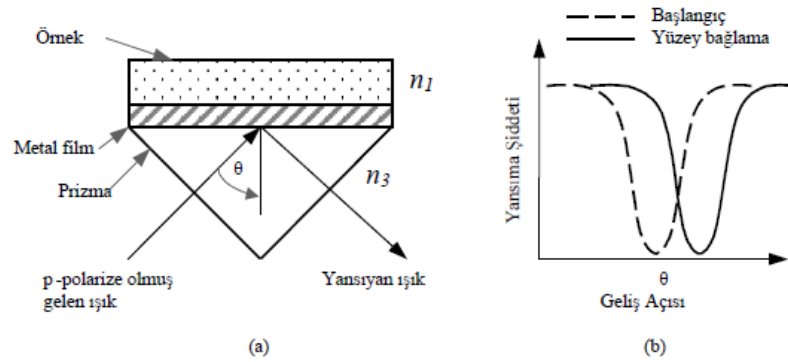
Işıma biyosensörler aynı zamanda yüzeye özel bağlanma olaylarını ölçebilmektedirler. Dalga kılavuzları, arzu edilen optik özelliklere sahip materyallerden yapılabilirler ve kolayca biyoalgılama materyallerinin sabitlenirken kolayca değiştirilebilirler. Sensör tasarımı, çok çeşitli görünebilir ve IR yakınındaki ışık kaynakları ve dedektörlere bağlı olarak adapte edilebilir.

Burada bahsedilen sistemlere ilaveten, ışıkla etiketlenen habercilerin uyarılması için çabuk kaybolan dalgadan yararlanan fiber optik ve düzlemsel diziliş ışıma sensörleri, örnek bileşenlerinin yüzey tutunmasında belirli bağlanmayı, belirsiz bağlanmadan ayırma noktasında gelişme kazanmıştır [92]. Ancak, kaybolma alanı dışındaki biyoetkileşimler, bu bölge tarafından kapsanmadıkları için tespit edilebilir değildir. Bu durum da hücreler gibi büyük hedeflerin tespitini oldukça zorlaştırmaktadır. Buna ilaveten, kritik akış oranının altında, toplu taşınma, hedef analitin sabitlenmiş biyoalgılama materyallerine bağlanmasını sınırlayabilir. Işıma transdüserler ışıma biyosensör oluşturmak için her tip biyoalgılama materyalleriyle geniş şekilde kullanılmaktadır. Son zamanlarda, ışıma etiketli antikolar ve toplam dahili yansıma ışıma temelinde, su kirliliği kontrolünde gözlem altında tutulan pestisitler de dahil çoklu analitler için taşınabilir bir optik imüno sensör geliştirilmiştir [93]. Yeşil ışınır protein mutantları, bakteril endotoksin [94] tespitinde ışıma biyosensör de kullanılmış ve kuantum noktaları, ışınır etiketler olarak bir imüno sensör içinde tavuk karkas yıkama suyu içindeki Salmonella typhimurium tespitinde kullanılmıştır [95]. Çeşitli derleme makaleleri; arka planı, gelişimi ve ışıma biyosensör uygulamalarını genliğı azalan dalga ışıma biyosensörler [92], ışıma-tabanlı glikoz biyosensör [96], ve canlı-hücre ışınır biyosensörler [97]'de dahil olmak üzere kapsamaktadır.

SPR Biyosensörler: Yüzey plazmon rezonansı (SPR, Surface Plasmon Resonance) dönüştürmesi, sensör arayüzü üzerindeki ince biyolojik filmlerinin optik yansıma indeksindeki (RI, Refractive Index) küçük değişiklikleri ölçmede analitik bir araç olarak yaygın şekilde kullanılır. SPR, yüksek derecede iletken bir metal ve bir dielektrik materyal arasındaki arayüz boyunca uzanan bir yüzey plazmonunun optik uyarılması sonucu oluşur. Uyarılma koşulları, metal ve örnek materyallerin

geçirgenliğince ve aynı zamanda dalga boyu ve anlık ışının açısı tarafından belirlenir (Şekil 6). Rezonans açısı, kırılma indeksindeki (RI) ve gerçek metal yüzeyden 800 nm'ye kadar olan bir mesafede arayüzdeki dielektrik sabitindeki değişikliklere karşı hassastır. Yüzeyden mesafe arttıkça, hassasiyet katlanarak düşer, bu da SPR tabanlı biyosensörün küçük partiküller üzerinde daha iyi çalışmasını sağlar [98]. RI'daki değişiklik, sensör yüzeyinde devam eden biyokimyasal reaksiyon ile ilgilidir. Bundan dolayı, bir antijen-antikor sistemi ve bir DNA tamamlayıcı parça sistemi, SPR-tabanlı biyosensör üretiminde kullanılmaktadır.

Sensör yüzeyindeki elektrik yüklerinin miktarı, diğer parametreler sabit tutulurken, ani ışımaların dalgaboylarındaki, açısının, yansıma yoğunluğunun ve örneklerin yansıma indeksi değiştiğinde, yansıma fazı değişikliklerin ölçülmesi gibi çeşitli şekillerde belirlenebilir.



Şekil 6. SPR biyosensörü prensipleri. (a) Uyarılmış yüzey plazmonları için üç katmanlı geometri. Bir yüzey plazmon dalgası, metal arayüzde uyarılır. (b) SPR reaksiyonu.

SPR biyosensörlerinin avantajları; SPR, biyokimyasal etkileşimlerin gerçek zamanlı olarak ve yüksek hassasiyetle ölçülmesine izin verir; ve analitlerin tespiti için etiketlenmelerine ihtiyaç duyulmaz. Ancak, SPR, çoğu doğrudan tespit metotları gibi, yüzey emilimine bağlıdır ve aynı boyutta olan emilmiş moleküllerin kendi özelliklerinden dolayı mı yoksa başka sebepten dolayı mı emildiklerini ayırt edemez [99].

Günümüzde, ticari olarak bulunabilen Biacore (Uppsala, Sweden) tarafından geliştirilen SPR-tabanlı biyosensör sistemleri, farklı örneklerdeki biyolojik ve kimyasal etken maddelerin tespit edilmesinde ciddi anlamda gelecek vaat etmektedirler. Texas Instruments (Dallas, TX) ve Nycomed Amersham (Buckinghamshire, UK) gibi diğer şirketler, biyoalgılama materyallerinin dalga kılavuzu üzerine kaplanmasıyla kolayca biyosensörlere dönüştürülebilen SPR sensörleri sunmaktadır. SPR dönüştürme teknolojisi, diğer birçok biyoalgılama materyalleriyle birlikte SPR optik biyosensörlerin tasarımında kullanılmıştır. Örneğin, küçültülmüş bir yüzey plazmon rezonans biyosensörü, E. coli O157:H7 [100]'nin tespitinde kullanılmıştır ve bir SPR biyosensörü karideslerde

thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine ve chloramphenicol kalıntıları tespiti için geliştirilmiştir [101].

Optik Fiber Biyosensörler: Bir optik fiber, sistem tespiti için örneği uzaktan kontrol ederken ışığa rehberlik etmek ve ışığı örnekten çevirmek için düz transdüser olarak kullanılır. Aracının kendisinin doğal optik özelliklerindeki değişim bir dış spektro-foto-metre tarafından algılanır. Optik fiberin yanındaki polimerik desteğin üzerine veya içine yerleştirilen bir indikatör veya kimyasal ayıraç, tespit edilebilir optik sinyal üretmek için aracı olarak kullanılır. Optik fiberleri dönüştürme metodu olarak kullanmanın avantajları, sahada kullanım kolaylığı ve gerçek-zamanlı tespit, rahatlık ve esneklik, potansiyel uzun etkileşim ve düşük maliyettir.

Fiber optik biyosensörlerinden biri de düzlemsel dalga kılavuzu optik biyosensördür. Bu biyosensör kaybolma etkisinin tespitini temel almıştır. Kaybolan dalgalar (EW, Evanescent Waves), dolaşan ışığın dalga kılavuzundan geçerken, çözeltiyle doğrudan temas ettiği sırada ortaya çıkar ve dalga kılavuzu yüzeyinde toplam dahili yansımaya uğrar. EW, çözelti içinde yayılır ve solüsyon yüzeyinden uzaklaştıkça katlanarak bozunur.

Kaybolma alanı içindeki bağlayıcı, etiketli antikolar, örnek antijenin konsantrasyonu ile ilgili olabilirler. Ölçülen değişiklik, emilim, ışımaya veya ışık saçılması olabilir.

Fiber optik biyosensörler, gıda işleme ve çevre izleme uygulamalarında çok başarılı sonuçlar sergilemişler ve hem pestisit kalıntıları hem de bakteri hücreleri tespitinde çok iyi performans göstermişlerdir. Işınır ışığın dar nüfuz derinliği, sonuç olarak hedef bakterinin etkin şekilde yakalanmasını gerekli kılmaktadır. Ancak, optik fiber'in temas eden alanı (genellikle çok küçük bir alan) ve gıda örneğinin karmaşıklığı, etkin bir yakalama kabiliyetini garanti edememektedir. Aşılması gereken diğer bir engel, pratik uygulamalarda fiber ucun yeniden meydana gelmesidir.

Diğer Optik Biyosensörler: Robinson ve meslektaşları tarafından geliştirilen [102] ışınır kılcal -dolum cihazı (FCFD, Fluorescent Capillary Fill Device) EW tabanlı biyosensörler için tipik bir oluşum formatıdır. Bu cihaz, bir birinden 100 µm'lik yakın mesafeyle ayrılmış iki cam düzlem içerir. Alttaki düzlem, optik dalga kılavuzu gibi davranır ve kendi yüzeyinde sabitlenmiş bir antikor tabakası taşır. Bu biyosensör kılcal doldurma sisteminden yararlanır, sistem kullanımı kolay yüksek hacimde yeniden üretilebilir örnek verir. Tüm ayıraç maddeler FCFD cihazında bulunduğundan, kullanıcının ayıraçla kuluçkaya yatırmak için biyosensörü örneğe sadece daldırması yeterli olacaktır. FCFD, hem küçük hem de büyük analitleri geniş çaplı örnek matrisleriyle, her hangi bir ön işlem gerçekleştirmek zorunda olmadan analiz etmek için kullanılır.

Mikro temas baskı antikor modelleme süreci için iyi bir alternatif sunar bu da yeni optik bir biyosensör ortaya koyar. Antikor-öğütücü bir model silikon yüzey üzerine basılır. Antikor öğütücü tek başına önemsiz bir optik difraksiyon üretir, ama analitlerin imüno-yakalanmasıyla, optik faz değişimi, difraksiyon modelinde değişime yol açar. Bu teknik, yüzeydeki değişikliklerin büyük kısmını ve ikincil imüno-kimyasal veya bağışıklık deneyinde yaygın olan enzim-bağlantılı adımları önler.

Başka bir tip optik biyosensör de, toplam dâhili yansımayı temel alan rezonant ayna (RM, Resonant Mirror) biyosensörüdür. Dalga kılavuzu cihazının gelişmiş hassaslığı, sade yapısı ile SPR biyosensörünün çalışmasını bir araya getirir [103].

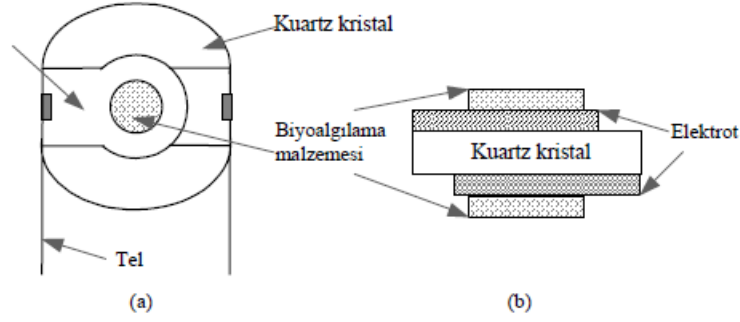
TIRF, düzlemsel ve fiber optik dalga kılavuzlarıyla birlikte optik biyosensörlerde transdüserler olarak kullanılır. Işık bir dalga kılavuzundan geçirilerek yayılır ve dalga kılavuzunun optik olarak daha yoğun madde yüzeyi üzerinde kaybolan bir dalga, bitişik daha az optiksel yoğun alanda bitişik dalga olarak oluşturur. Durağan dalga sinyali, alt ışık kırıcı materyalle aradaki mesafe ile birlikte katlanarak azalır. Biyoalgılama materyalleri dalga kılavuzunun yanında sabitlenebilir ve kaybolma alanı içinde uyarılan ışımaya dalga kılavuzu dışında toplanabilir. TIRF, FCFD’de ve rezonans ayna cihazlarında kullanılır.

Optik ve ışımaya biyosensörlerle ilgili kitaplar [104] ve [105]’dedir.

Pizoelektrik Biyosensörler

Pizoelektrik biyosensörler, elektrik, kütle ve viskoelastisitede geliştirilen teorileri temel almış ve ticari olarak bulunabilen kuartz kristal mikrobalsan gibi enstrümanları kullanmaktadır. Pizoelektrik sensörler, diğer tip sensörlere göre hassasiyet, çok yönlü uygulama, düşük maliyet ve basitlik açısından üstünlük göstermekte ve etiketsizdirler.

Tipik bir piezoelektrik algılama başı, kuartz kristal levhayı ve kristalin iki zıt yanına yerleştirilmiş iki uyarma elektrotundan (Şekil 7) oluşur. Levha doğal veya sentetik kuartz kristalinden kesilir. Elektromekanik birleşme ve uygulanan elektrik alanından kaynaklanan gerilim kristal simetrisi, kesme açısı ve elektrot konfigürasyonuna bağlıdır. Farklı elektro-mekanik birleşme, kalınlık kesme modu (TSM, Thickness Shear Mode), yüzey akustik dalga (SAW, Surface Acoustic Wave), yatay kesme (SH, Shear Horizontal) SAW, SH akustik düz mod (APM, Acoustic Plate Mode) ve bükülgen düz dalga (FPW, Flexural Plate Wave) da dâhil, farklı tiplerde akustik dalgalara yol açar.



Şekil 7. QCM biyosensörde kullanılan pizelektrik kristal algılama başının yapısı, (a) üstten görünüm ve (b) en-kesit görünümü.

Pizelektrik biyosensörler, temel olarak kristal yüzeyi üzerindeki kütle değişimi sonucu pizelektrik kristalinin rezonant frekansındaki değişikliklerin ölçülmesi üzerine temellenmiştir (genellikle antikor-antijen reaksiyon veya bir DNA parçası ve bunun tamamlayıcı sırası gibi biyokimyasal etkileşim tarafından sebep olunur). İki ana tip pizelektrik cihaz bulunmaktadır: kuartz kristal mikrobalaans (QCM, Quartz Crystal Microbalance) ve yüzey akustik dalga (SAW) cihazı. Pizelektrik biyosensörler üzerine yapılan yoğun araştırmalar, bu sistemlerin biyokimyasal reaksiyonları tek adımda, düşük maliyetli olarak tespit etme potansiyelini göstermektedir.

15 MHz altındaki frekanslarda çalışan QCM, pizelektrik kristalin yüzeylerindeki değişimlerin incelenmesinde ve ilgi duyulan antikorun takip eden tespitinde kullanılmıştır. Frekans atlama ve yüzey kütle değişimi arasındaki ilişki Sauerbrey denklemi ile verilmiştir:

$$\Delta f = -2.3 \times 10^6 f_0^2 \Delta M/A \quad (10)$$

Burada $\Delta f = \text{Hz}$ biriminde, kaplamalı kristalin frekansındaki değişiklik

$f_0 = \text{MHz}$ biriminde kristalin rezonant frekansı

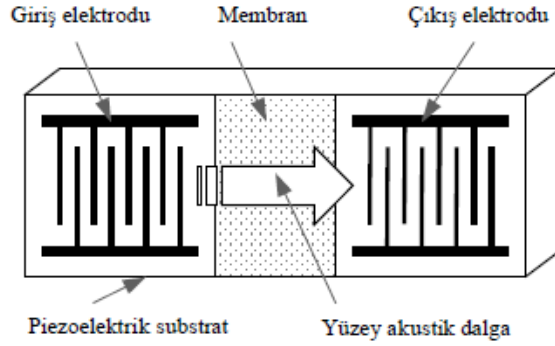
$A = \text{cm}^2$ biriminde kaplanmış alan

$\Delta M = \text{g}$ biriminde depolanmış kütle

10 MHz'lik bir AT-kesim kuartz kristalinden yapılmış bir QCM'in hassasiyeti $4 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ olabilir. Bu cihazlar, 0.01 ve 1 Hz arasında frekans tespit limiti ile sıvı fazda çalışabilir ve elektrot yüzeyine bağlı kütlenin tespit limiti 10^{-10} ile 10^{-12} g arasındadır.

Normalde 100 MHz frekansın üzerinde çalışan bir SAW cihazı, aynı zamanda biyosensörlere de uygulanabilir. Daha karmaşık denklemler, farklı tiplerdeki SAW cihazları için türetilmiştir. Şekil 8, SAW biyosensörünün temel yapısını göstermektedir. Bu cihazlar, kütle hassasiyeti çalışma frekansıyla doğrudan bağlantılı olduğundan, QCM'e göre yüksek hassasiyet sağlarlar. SAW cihazları peptitlerin

tespitinde, DNA sıralamasında, patojenler ve pestisitlerde yüksek hassasiyet sergilemişlerdir. Ancak, piezoelektrik biyosensörler, tespit limitleri ve tekrar kullanılabilen elektrotlarıyla bazı dezavantajlara sahiptir.



Şekil 8. SAW biyosensörü prensibi.

Pizelektrik imüno sensörler sensörlerin önemli bir özelliği, etiketsiz olarak tasarlanabilen olabilmeleridir. Antikor antijen akrabalığı reaksiyonunun avantajını kullanan imünosensörler, yüksek belirginlik ve çok amaçlı kullanılabilme özelliklerine bağlı olarak en çok gelecek vadeden biyosensörler arasındadır. Geleneksel imünosensörler genellikle sandviç imünobileşik formunu alırlar ve sabitlenmiş temel antikor, etiketi doğrudan veya dolaylı olarak tespit etmek için optik veya elektrokimyasal ölçümün takip ettiği yakalanmış hedef analit ve etiketli ikincil antikordan oluşurlar. Piezoelektrik imünosensörler etiketli antikora ihtiyaç duymazlar ve sandviç imüno sensörlere kıyasla bu derece basit ve uygulamada kolaylık sağlarlar.

İlk piezoelektrik imünosensör, Shons ve meslektaşları [106] tarafından bildirilmiştir. Bunlar kuartz kristali sığır serum albumin (BSA, Bovine Serum Albumin) ile modifiye ederek ve anti- BSA antikorların tespitinde kullanmışlardır. Bu noktadan sonra, çok sayıda piezoelektrik imünosensörlerin, küçük moleküllerden, biyolojik makro-moleküllere, tüm virüsler ve hücrelerden gelen çeşitli analitlerin tespitinde kullanıldıkları belirtilmiştir. Kısaca, bir piezoelektrik imüno sensör, AT kesim PQC yüzeyinde belirli bir antikor/antijenin sabitlenmesi ile üretilir.

İmmüno algılama yüzey, bir numune çözeltisine maruz bırakıldığı zaman, sabitlenmiş antikor/antijen ve bunun tamamlayıcı kısmı (hedef analit) arasında bağlayıcı bir reaksiyon meydana gelir. Bağlayıcı olay, QCM tarafından kaynaklandığı yerde yüzeydeki yük kütlelerinde ve/veya viskoelastisite gibi diğer özelliklerdeki değişim temel alınarak gözlenir ve böylece hedef türler miktar bazında tespit edilir.

Piezoelektrik genosensörler, tek dizilişli bir DNA/ RNA probunun PQC yüzeyinde sabitlenmesiyle üretilirler. Sabitlenmiş DNA/RNA probu bunun örnekteki kendi tamamlayıcı dizisi arasındaki spesifik hibritizasyon, QCM'nin rezonant frekansında değişikliğe yol açar. DNA problemlerinin QCM yüzeyi üzerinde

sabitlenmesi için çeşitli metotlar kullanılmıştır. Bunlar arasında, SAM metodu en yaygın şekilde kullanılmaktadır çünkü düzenli, kararlı ve kullanışlı bir sabitleme sağlar.

Thiolated oligonükleotitleri, Au thiolate bağı aracılığı ile QCM elektrotunun altın yüzeyi üzerinde doğrudan bir SAM oluşturabilirler. QCM transdüserleri tipik olarak antikorlar ve DNA/RNA problemleri ile birlikte biyosensör meydana getirmek için kullanılır. Son zamanlarda, bir QCM immüno sensörü üzerinde, domuzlarda üreme ve solunum sendromu virüs enfeksiyonu tarama çalışmaları [107], E. coli O157:H7 [108] tespiti için a langasit saf kesme SAW biyosensörü; ve kümes hayvanlarında Salmonella tespiti için QCM immüno sensörünün eş zamanlı rezonant frekans ölçümü ve hareketsetel dirençle bir arada kullanıldığı rapor edilmiştir [109].

Piezoelektrik biyosensörler ile ilgili daha fazla bilgi, [13,110–115]'de bulunabilir.

Termal Biyosensörler

Termal biyosensörler aynı zamanda *kalorimetrik biyosensörler* olarak adlandırılır. Bunlar bir biyoalgılama materyalinin (enzim, organel, mikroorganizma, bitki veya hayvan hücresi veya doku) termometre, termopil veya termistör gibi bir fiziksel transdüser ile bütünleştirilmesi ile geliştirilmişlerdir. Tablo 1'de gösterildiği üzere, analitik çözelti kalorimetrisinde, enstrümanlar ısı iletimi, isoperibol kalorimetri ve izotermal kalorimetri [116] şeklinde sınıflandırılır. Biyokimyasal reaksiyonlar için entalpi değişimi 25 ve 100 kJ mol⁻¹ [117] aralığındadır. Örneğin, glikoz oksidaz ile katalize edilen glikozla tedavi; veya ürazla katalize edilen üre, sırasıyla 80 ve 49 kJ/mol ortaya çıkarır. Genel olarak, izotermal koşulların, biyosensör sinyallerinin açıklanmasında yer aldığı düşünülür. Ya biyosensörün termal kütlesi, ısının hızla dağılacağı şekilde çok büyüktür; ya da tüm cihazın ısı bir su sirkülasyonu vasıtasıyla düzenlenmektedir [19]. Termal biyosensörler üç grupta da geliştirilmiştir. Ama, en fazla termal biyosensör termistör-tabanlı biyosensörlerdir ve bunlar belirli enzimlerin dâhil olduğu biyokimyasal reaksiyonlar sırasında açığa çıkan ısı ölçümü tabanlıdır. İki temel sebep, termistör biyosensörleri daha başarılı kılmaktadır: son derece hassas ve küçültülmüş termistör ve çok kolay akış-enjeksiyon analizi (FIA, Flow Injection Analysis). Termistör biyosensörler, 0.001°C'de ısı değişikliklerini tespit edebilecek çok hassas termistöre ihtiyaç duyarlar.

Termal biyosensörler, Lammers ve Scheper tarafından enzimatik sürecin sürekli olarak izlenmesinde kullanımları konusunda değerlendirilmişlerdir [118]. Ramanathan ve Danielsson [119] çeşitli enstrümanlar, materyaller ve metotlarla termometrik ölçümlerin prensipleri konusunda bir değerlendirme sunmuşlardır. Ayrıca enzim aktivitesi ölçümleri, klinik izleme, süreç izleme ve kontrol, multianalitik tespiti, hibrit algılama, çevresel izleme ve susuz ölçümler için termistör tabanlı kalorimetrik biyosensörler tanımlamalarını sunmuşlardır. Örneğin, bir sol jel ve termometrik ölçüm tabanlı enzim biyosensörü, meyve suyu, kola ve insan kanında

glikoz tespiti [120] için kullanıldığı; ve bir sabitlenmiş tavuk karaciğeri esterazı tabanlı akış enjeksiyon kalorimetrik biyosensörünün çevre ve gıdalarda dikolorvoz kalıntıları tespitinde kullanıldığı bildirilmiştir [121].

Tablo 1. Termal sensör ve enstrümanların prensipleri ve sınıflandırılması.

Grup	Kural	Sensörler
Isı İletimi	Reaksiyon kabı ile kendini saran bir izotermal soğutucu arasında bir termoelektrik çeviricinin gerilimini ölçün	Calvet mikrokalorimetre Termopil sensörü Entegre silikon termopil sensörü
Izoperbol kalorimetre	Reaksiyon çözeltisinde sıcaklık değişimini ölçün	Termistör Küçültülmüş termistör
Izotermal kalorimetre	Isı telafisi ile bir reaksiyon kabının sıcaklığını sabit tutun	Kalorimetrik mikrosensör

Manyetik Biyosensörler

Son zamanlarda, manyetik biyosensörler daha fazla dikkat çekmektedir ve bu konu Megens ve Prins [122] tarafından değerlendirilmiştir. Mikroakışkan kanallar içindeki manyetik mikro ve nano partiküllerin magnetodirenç etkisi kullanılarak hassas şekilde tespit edilmesi temelinde boyutları küçültülmüş biyosensörler, hassasiyet ve boyut bağlamında gelecek vaat etmektedir. Ancak, gelecekteki zorluk, örneğe nüfuzu ve tespiti tek bir kartuşta bir araya getirerek işi otomatik olarak yapabilmektir. Manyetik partiküller ayrıca mikro kanallardaki biyoreaksiyonlara belirgin bir destek olarak kullanılmakta [123] ve tek bakteril hücreler manyetik-hidro-dinamik akış tarafından yüklenebilir ve taşınabilir [124].

2.3.5 Biyoalgılama Materyallerinin Sabitlenmesi

Biyosensörün cevap sinyallerini alabilmek için, biyoalgılama materyalleri transdüser ile bağlanmalıdır. Biyoalgılama materyalleri transdüserler üzerine sabitleyici fiziksel ve kimyasal metotlar tipik olarak emilim, mikro hapsetme, tuzağa düşürme, çapraz bağlama ve kovalent bağlamadır [20,24]. Sabitlemenin belirli prosedürleri transdüser yüzeyinin doğasına, biyoalgılama materyallerinin özelliklerine ve biyosensörün yapısına bağlıdır.

Enzimler ve antikorları değerlendirdiğimizde, bu moleküller metal, metal oksit, karbon ve cam yüzey üzerinde tutunurlar ve transdüserler için hidrofobik, iyonik ve Van der Waals etkileşimlerle yaygın şekilde kullanılırlar [23]. Yüzeye tutunma, biyoalgılama materyalleri üzerinde daha az bozunmaya yol açan en basit sabitleme metodudur. Ancak, bağlanma zayıf ve kullanım ömrü kısadır (birkaç gün). Yüzeye tutundurulmuş biyoalgılama materyali, ısıdaki, pH'daki, iyonik güçteki, akış oranı ve substratlardaki değişimlere karşı hassastır. Ayrıca, tutundurma, biyoalgılama materyallerinin kimyasal dönüştürmede optimal etkinlik için moleküler odaklanmasını desteklemez.

Tuzağa düşürme metodunda, biyoalgılama materyali, transdüser yüzeyi yakınında bir jel, macun veya bir polimer matrisi içinde tuzağa düşürülür. Jellere polyacrylamide, nişasta jeli, naylon ve silastic jeller dâhildir. Polimetrik materyaller, iyi yapılanmış bir iskelet, seçici iyon geçirgenliği, gelişmiş iletkenlik gibi birçok

fonksiyon kazandırabilir ve elektron transfer sürecine aracılık eder. Tuzağa düşürme metodu, transdüser yüzeyinde makro-moleküllerin sürekli konumlanmasını sağlayamaz ve ömrü nispeten kısadır, genel olarak birkaç hafta kadardır.

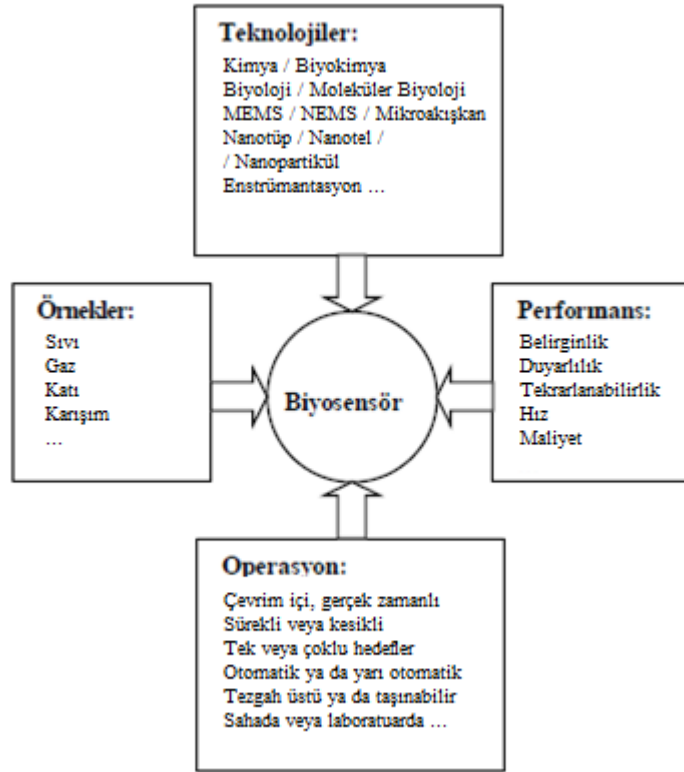
Çapraz bağlama metodunda, genelde glutaraldehide, hexamethylene diisocyanate ve 1,5-dinitro-2,4-difluorobenzene gibi çift işlevli etken maddeler, biyomoleküller arasında katmanları kararlı hale getirecek moleküller arası bağları oluşturmak ve transdüser üzerindeki biyoalgılama materyallerinin sabitlemesinde reaksiyon tabakalarından sızmasını önlemede kullanılır [125]. Bu metot yüksek mekanik dayanıklılık sağlamaz ve substrat difüzyonunu sınırlayabilir.

Kovalent bağlanma kullanıldığında, kovalent kimyasal bağları biyoalgılama materyali ve transdüser yüzeyi arasında oluşur. Enzimler, antikorlar, karbohidratlar ve oligonükleotitler belirli moleküler özelliklere sahiptirler. Proteinler, makro-moleküllerde, normal olarak amino, karboksil, sulfhydryl veya amino asitlerin aromatik yan zincirlerine bağlanırlar. Yüzeyde tutundurma, tuzağa düşürme ve çapraz bağlama metotlarıyla kıyaslandığında, kovalent bağlanma daha iyi ve aylarca kalıcılığı süren yüzey yapısı sağlamaktadır.

Mayes [125], biyoalgılama materyallerinin sabitleme kimyası üzerine detaylı bilgileri ve mevcut tekniklerin bir özetini sunmuştur. Farklı transdüser materyaller (altın, cam, silika, metal oksitler, karbon ve polimerler) için farklı biyoalgılama materyallerine (enzimler, antikorlar ve diğer biyomoleküller) göre sabitleme metotları değerlendirilmiştir. Sabitlenmiş antikorların konumlandırılması, eklenen glikozitler, özellikle yerleşmiş tiyol grupları, antikor bağlayıcı proteinler [126], avidin/streptavidin-biyotin bileşimi [127] ve mühendislik çabalarıyla oluşturulmuş antikor parçaları içeren etiketler sayesinde kovalent eşleştirme kullanılarak kontrol altına alınabilir. Özel yüzey sabitleme kontrolü, uygun yüzey fonksiyonelliği sağlamak için substrat modelleme, fiziksel yerleşme ile birikimin kontrolü, ışıkladare edilen sabitleme ve modelleme ve birikimin elektro-kimyasal kontrolü ile gerçekleştirilebilir. Duschl [128], sabitlenmiş biyolojik sistemlerde, bağlanma sabitlerini ve kinetik oran sabitlerini belirlemek için teorileri ve pratik yaklaşımları açıklamıştır. Cunningham [23] tarafından bahsedildiği üzere, seçici bileşenlerin optimal yüklenmesi ihtiyaçlarını karşılamak, uygun şekilde yapılmış ince filmler, etkin biyomolekül bağlama için uygun yönelme ve iyi tasarlanmış küçültme için modellenmiş yüzeyler için gittikçe daha fazla sayıda yüzey modifikasyon ve sabitleme tekniği geliştirilmiştir.

2.3.6 Biyosensörlerin Tasarımı

Biyosensörlerin tasarımında, temel düşünceler: örnekler, performans kriteri (veya gerekli özellikler), çalışma koşulları ve yeni teknolojilerdir (Şekil 9).



Şekil 9. Bir biyosensör tasarımında önemli hususlar.

Örnekler ve Hazırlanışları

Örnekleme tekniği, başarılı biyosensör uygulamalarında kritik öneme sahiptir. Özellikle, tarımsal veya gıda ürünlerinden, gıda işleme veya doğal çevreden gelen örneklerde birçok bilinen, bilinmeyen, organik ve inorganik materyalleri mevcuttur. Aynı zamanda, tarımsal, gıda veya çevresel örneklerde var olan pestisit kalıntıları ve gıda kaynaklı patojenlerdeki hedef analitlerin konsantrasyonu genellikle çok düşüktür (pestisitler için birkaç ppb ve bakteri için birkaç cfu/mL). Örnek nüfuzunun, hedef analitlerin ayrıştırılmasının belirginliği geliştirdiği ve hedef analitlerin konsantrasyon alt tespit limitini geliştirdiği çok açıktır. Bundan dolayı, arzu edilen nokta, örnek nüfuzunun biyosensör enstrümanının bir parçası haline gelmesidir.

Genellikle, üç metot; filtrasyon, santrifüj ve manyetik imüno-ayırıştırma, laboratuarlarda hedef analiti örnekten ayırştırmak ve sonra biyosensörlerin ölçümü konsantre hale getirilmesi için kullanılır. Manyetik imünoayırıştırma, hızlı, kolay ve otomatik bir uygulama olduğundan biyosensörler için daha uygundur. Gijs [129] tarafından değerlendirildiği üzere, manyetik mikropartiküller ve nanopartiküller, kalıcı mıknatıs veya elektro-mıknatıslar kullanılarak manyetik olarak manipüle edilebilirler. Taneciklerin sıvıya oranla artan nispi hareketine bağlı olarak, fonksiyonellik kazandırılmış tanecikli yüzeyin kendini saran sıvıya maruz kalma sürecinin gelişimine ve daha yüksek etkinlikte örnek ön-konsantrasyona zemin teşkil eder. Manyetik olarak etiketlenmiş hücreler, düzenlenmiş bir manyetik alan altında

seçilebilir, ayrıştırılabilir ve hizalanabilir [130]. Bir çalışma, belirli antikorlarla kaplanmış manyetik nanopartiküllerin, manyetik mikro taneciklere göre E. coli O157:H7'yi kıyma ve süt örneklerinde ayrıştırma sürecinde daha etkin yakalama kapasitesine sahip olduklarını ve bunların otomatik çalışma ve küçültme [131] için daha uygun olduklarını göstermiştir.

Performans Kriteri

Belirlilik veya seçicilik, bir biyosensörün performansının değerlendirilmesinde en önemli faktördür. Biyosensörde kullanılan, enzimler, antikorlar, DNA problemleri veya mikroplar gibi biyoalgılama materyalinin doğası tarafından belirlenir. Çoğu durumda, hedef analit için, hatalı pozitif oran ölçülebilir. Benzer şekilde, hatalı negatif oran da bazı biyosensörlerin belirliliğinin tespitine yardımcı olması için kullanılabilir. Hatalı pozitif/negatif oranı %0,1'den %5'e kadardır. Günümüzde bir biyosensörden %0,1'den az oran talep etmek çok pratik değildir. Aynı zamanda, bir biyosensörün %5'in üzerinde bir oran göstermesi kabul edilebilir değildir.

Daha düşük bir tespit limiti, biyosensörün kalitesini gösteren ikinci önemli faktördür. Alt tespit limiti, analitlerin, örneklerin ve biyosensörün yapısına bağlı olarak farklı şekillerde belirlenebilir. Bunlardan bir tanesi, en düşük tespit edilebilir sinyal temel alır. Tespit limiti ayrıca tanımlanmış sinyal / gürültü oranını temel olarak belirlenir, geleneksel olarak ≥ 3 'dür. Her iki sinyal ve gürültünün çok değişkenlik gösterdiği durumda, alt tespit limitini, sinyal ve gürültü arasında ciddi değişiklikleri temel olarak belirlemek için istatistiksel bir test kullanılabilir.

Hassasiyet, biyosensör çıkış sinyalinde değişimin, hedef analit konsantrasyonundaki değişime oranı olarak tanımlanır. Dolaylı biyosensörlerde, bir kimyasal reaksiyonda, genellikle, hedef analitin konsantrasyonu değil, eş-tepken veya eş-ürünlerin konsantrasyonlarındaki değişiklikler ölçülür. Böylece, çıkış sinyallerinin büyüklüğü ve hedef analitin konsantrasyon verileri kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi çizilebilir. Biyosensörün farklı konsantrasyonlarda hedef analit içeren standart bir çözeltiye maruz bırakılmasıyla elde edilebilir. Sonra, kalibrasyon eğrisinin doğrusal kısmının eğimi hassaslığı verir. Farklı biyoalgılama materyalleri ve dönüştürme cihazlarına bağlı olarak bir biyosensörün hassaslığını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Biyosensörün hassaslığının her zaman aynı kalması ve güvenilir sayısal sonuçlardan emin olacak kadar yüksek olması beklenir.

Tespit süresi, biyosensörleri diğer analitik enstrümanlardan ayıran en önemli unsurlardan biridir. Bir biyosensörün tespit süresi örnekleme aşamasından sonuçların okunduğu ana kadar hesaplanmalıdır ve değeri birkaç saniyeden birkaç dakikaya kadar değişir. Bazı biyosensörler için, cevap süresi ve sıfırlama süresinin de bu hesaba katılması gerekir. Cevap süresi, bir biyosensörün ölçüm sinyalinin bir denklem içinde gelebilmesi içindir. Fiziksel ve hatta kimyasal sensörlere kıyasla, biyolojik algılama materyalleri genellikle bir biyosensörün cevap süresini uzatırlar. Sıfırlama süresi, bir biyosensörün bir sonraki örnekte kullanım için gerek duyduğu

hazırlık süresidir. Çünkü biyosensör yıkandıktan, biyoalgılama materyalleri yeniden oluşturduktan veya algılama çiplerinin veya kartuşlarının değiştirilmesinden sonra temel denge yeniden başlatmaya ihtiyaç duyulabilir.

Biyolojik örneklerde ve biyoalgılama materyallerinde büyük değişkenlik beklendiğinden biyosensörlerin değerlendirilmelerinde tekrar edebilirlik ve yeniden üretilebilme özellikle önemlidir. Tekrar edilebilirlik genellikle bağıl standart sapma olarak ifade edilir ve kalibrasyon eğrisi çizebilmek standart sapmayı hesaplayabilmek için yeterli kopyaları biriktirilerek belirlenebilir. Biyosensörün beklenen tekrar üretilebilirliği $\pm 1\%$ ile $\pm 10\%$ arasındadır.

Biyoalgılama materyalleri, zamanla ısıdan, nemden, pH ve diğer faktörlerden etkilenerek bozulan organik materyaller olduğundan kullanım ömrü biyosensörlerde oldukça önemli bir faktördür. Gerçekte, bir biyosensörün standart örnek değişikliklerine cevap sinyali, kullanılan biyoalgılama materyallerine bağlı olarak aylar, günler veya hatta saatlerle ifade edilir.

Üç tip kullanım ömrü belirlenmiştir: kullanımdaki bir biyosensörün ömrü, depodaki bir biyosensörün ömrü ve ayrı şekilde depolanan biyoalgılama materyallerinin ömrü [132]. Çoğu biyoalgılama materyallerinin, kontrollü bir depoda saklandıklarında en az 6 ay ömre sahip olması beklenmekte ve çoğu biyosensörlerin günler ve haftalar boyunca sürekli olarak kullanıldıkları göz önüne alınmalıdır.

Çalışma Koşulları

Tarım, gıda ve çevre uygulamalarında, biyosensörler, çevrim içi veya çevrim dışı; gerçek zamanlı veya değil; sürekli veya kesikli; ve sahada veya laboratuarda kullanılabilirler. Ayrıca, biyosensörler tezgâh üstü veya taşınabilir yapıda olabilir, kendi başlarına veya bir PC'ye bağlı şekilde çalışabilir ve tamamen otomatik veya yarı otomatik olabilirler. Biyosensörlerin klinik teşhisler ve ilaç tarama uygulamalarındaki kullanımlarına kıyasla, çevre uygulamaları biyosensörler gıda işleme fabrikaları, çiftlik veya sahada kullanıldıkları zaman ciddi ısı farklılıklarına, sarsıntıya, elektromanyetik alana ve toza maruz kalacaklarından, oldukça zor bir faktördür. Günümüzde hala biyosensörlerin laboratuara ve saha da kullanımları arasında büyük farklılık bulunmaktadır. Bir gıda işleme veya biyoişleme tesisinde kullanılan bir biyosensör için kullanılan dört ayrı çalışma modu bulunmaktadır: çevrim içi ve gerçek zamanlı, geri bildirimli çevrim içi, yerel çevrim dışı ve çevrim dışı uzaktan laboratuvar.

Mevcut Yeni Teknolojiler

Biyosensörlerin gelişimi, kimya, biyoloji, malzeme bilimi, mühendislik ve diğer çalışma alanlarını kapsadığından, bu disiplinlerdeki yeni teknolojilerle güncellemek bariz şekilde yararlıdır. Mikroakışkan çipler ve nanomateryaller buna iki örnektir.

Mikroakışkan çipler 90'lı yılların başında, elektroforetik ayırıştırılmalar için hayatımıza girmiştir. Geleneksel kılcal elektro-forezle kıyaslarsak, bu yeni cihazlar için çok daha kısa analiz süresi verilmiştir [133]. Bu avantaj, düşük termal ve verimli kütle transferine olduğu kadar, büyük kanal yüzey alanının, kanal hacim oranına bağlanmaktadır [134]. Buna ilaveten, bizi, yüksek analiz hızı, düşük ayırım seviyesi ve güç tüketimi açısından avantajlı olan *mikro toplam analiz sistem* (μ TAS) veya *çip-üstü-laboratuara* götürecek olan mikroakışkan cihazlar, pompalar, vanalar ve dedektörlerle uyum göstermektedirler. Mikroakışkan çipler, elektroforezde küçük moleküllerin, DNA ve antikorlar/antijenlerin tespitinde yaygın şekilde kullanılmışlardır. Yakın zamanda, Bange ve meslektaşları [135], mikroakışkan immüno sensör sistemler üzerine bir değerlendirme sunmuşlar; ve en çok kullanılan dönüştürme metodunun ışınır olduğunu, bunu elektrokimyanın takip ettiğini; uygulamalarda ise büyük moleküllerin tespitinde sandviç prosedürünün ve küçük moleküllerin tespitinde rekabetçi denemelerin yaygın olarak kullanıldığını işaret etmişlerdir.

Yeni, nanotüpler/nanokablolar/nanolifler (örneğin, karbon nanotüpleri ve TiO₂ nanolifleri) ve nanopartiküller (örneğin, manyetik tanecikler ve kuantum noktaları) nanoölçekli materyaller artık bulunmaktadır ve hedef ayırımı/konsantrasyon, boyut küçültme ve performans geliştirmek için bunların biyosensörlerle bir araya getirmek için büyük bir istek vardır. Yüksek en-boy oranı tek boyutlu (1D) nanotüpler gibi nanomateryaller özel ilgi konusudur. Son dönemlerde, örneğin, karbon nanotüpü tabanlı dual yükseltme rotası ultra-hassas elektro kimyasal biyosensörlerin proteinler ve DNA [136] tespiti için test edilmiştir; organofosfat pestisitler [137]'in doğrudan tespitinde optik biyosensörde OPH-altın nanopartiküller kullanılmıştır; ve gümüş nanopartiküllerin, glikoz biyosensörün [138] akıma verdiği reaksiyonu geliştirdiği rapor edilmiştir. Biyosensör tasarım ve üretiminde, materyaller ve teknik üzerine daha fazla bilgi, Davis ve meslektaşlarının [139]; ve Zhang ve meslektaşlarının [140] yaptığı derlemede bulunabilir.

2.3.7 Tarım, Gıda ve Çevre'de Biyosensör Uygulamaları

Biyosensör teknolojileri geliştirilerek tarım, gıda ve çevre alanlarına uygulanmıştır. Tablo 2 yayımlanan raporlara göre tarımsal üretim, gıda işleme, gıda kalitesi ve güvenliği ve çevresel izleme konularındaki analitik hedeflere göre biyosensörlerin bir listesini sunmaktadır. Tarım [141,142], gıda [4,143–146] ve çevre [147–149] alanlarında biyosensörlerle ilgili birçok derleme makalesi ve kitabı mevcuttur.

Tarımda, biyosensörler genellikle pestisit, suni gübre, kötü koku ve hayvan hastalıkları ölçümlerinde uygulanmaktadır. Pestisitler, günümüz tarımında kullanılan binlerce organik bileşikten bir gruptur. Yaygın kullanımından ve uygun olmayan uygulamalardan dolayı, pestisitler tarımda önemli kimyasal tehlikelerden biridir. Büyük miktarlarda kullanılan ve gıda ürünlerine ve yer altı suyuna bulaşmış

oldukları kabul edilen 64 pestisit bulunmaktadır [150]. Tarım kimyasalları için biyosensör uygulamaları [141], kirleticilerin ekinlerde ve toprakta alan analizlerinde, ekin ve canlı hayvanlarda hızlı hastalık tespitinde ve hayvan doğurganlığının izlenmesinde [151] değerlendirilmiştir. Enzimler, antikorlar ve hücre esaslı amperometrik, potansiyometrik, emilim ve ışımaya etiketli optik dönüştürme metodlarına sahip biyosensörler, tarımda kullanılan haşere mücadele ilaçları, yabancı bitki mücadele ilaçları ve mantarla mücadele ilaçlarının tespiti için geliştirilmişlerdir. Tarımsal örneklerde pestisit ve antibiyotik kalıntıları yoğun şekilde incelenmiş ve elektrokimyasal enzimatik biyosensörler [152,153], SAW biyosensörler [154], SPR biyosensörler [101] ve biyolojik ışımaya biyosensörler [89] kullanılarak uygulanmıştır.

Gıda alanında, biyosensörler, gıda bileşenlerinin kalite kontrolleri ve gıda güvenliği için mikrobiyal ve kimyasal içeriklerin tespiti gibi birçok uygulama alanı bulmuşlardır.

Tablo 2. Tarım, gıda ve çevre konularında biyosensör uygulamaları.

Uygulama	Analitik Hedefler	Biyosensör Tipleri
Tarım		
Insektisitler	Paraoxon, dichlorvos, aldicard, chlorpyrifos ethyl oxon, methamidophos, malaoxon, etofenprox, vb.	Amperometrik immüno ve enzim sensörler Potansiyometrik immüno ve enzim sensörler Emilim immüno ve enzim sensörler Floresan immüno ve enzim sensörler
Herbisitler	Atrazine, cyanazine, propazine, smazine, prometon, terbutryn, vb.	Hücre esaslı elektrokimyasal ve optik sensörler LAPS immüno ve enzim sensörler Fiber optik immüno sensörler
Fungusitler	Dithiocarbamate, carbofuran, metalaxyl, triadimefon, vb.	QCM immüno sensörler
Gıda		
	Putrescine, cadaverine	Amperometrik enzim sensörler
	hypoxanthine	Amperometrik immüno sensörler DNA / RNA sensörler
	L-lactate, D-lactate	Amperometrik hücre esaslı ve dokü sensörler
	Glukoz, sukroz, laktöz, fruktoz	Potansiyometrik enzim sensörleri
	Glutamate, aspartame	LAPS immüno sensörler
	Etanol, sülfid	Optik FLA biyosensör
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Floresan immüno sensörler, PCR-DNA sensörler
	<i>E. coli</i> O157:H7	SPR immüno sensörler, DNA sensörler
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Kemiluminesans immüno sensörler
	<i>Staphylococcus aureus</i>	QCM immüno sensörler, QCM-DNA sensörler Empedans immüno sensörler
	Diğer bakteriler ve virüsler	Termal enzim sensörler
	Antibiyotikler, pestisitler, fungusitler	
Çevre		
	Oksijen	Amperometrik immüno ve mikrop sensörler
	Paraoxon, atrazine, dithiocarbamate, vb.	Potansiyometrik hücre esaslı sensörler Empedans immüno sensörler
	Alkilat sülfonat	Fiber optik immüno sensörler, floresans sensörler
	Sefalosporinler, penisilinler, nystatin	Optik hücre esaslı sensörler LAPS immüno sensörler

Bazı ticari biyosensörler, balık ve et ürünlerinin tazeliğini belirlemek için kullanılmışlardır. Son yıllarda, çeşitli biyosensörler üzerinde, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella typhimurium* de dâhil gıda kaynaklı patojenlerin hızlı, hassas, belirli, düşük maliyetli tespiti için çalışmalar yapılmıştır. Bazı derleme makaleleri enzim esaslı amperometrik biyosensörleri gıda analizi [145]

için, biyosensörleri gıda güvenliğinde biyolojik ve kimyasal analitlerin ölçümü için [155], biyosensörleri patojenik bakteri [156-158] tespiti için ve biyosensör uygulamalarını gıda endüstrilerinde [54] incelemiştir.

Çevresel izlemede, biyosensörler, hava, su ve toprak örneklerinde pestisit kalıntıları, antibiyotik kalıntıları, toksinler ve mikropların tespiti ve BOD ölçümünde kullanılmışlardır. Biyosensörler, Dennison ve Turner [159] tarafından çevresel izleme açısından değerlendirilirken, Wang ve meslektaşları [160] çevresel izleme için DNA elektrokimyasal biyosensörleri incelemiştir. Toprak ve yüzey sularındaki pestisitlerin tespiti için elektrokimyasal enzimatik biyosensörler, [152,153,161,162] araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bir başka derleme makalesinde, Rodriguez-Mozaz ve meslektaşları [149] çevresel uygulamalar için çeşitli biyosensörleri işaret etmişler ve bunların gelecekteki trendlerinden bahsetmişlerdir.

2.3.8 Ticari Biyosensör Ürünleri

Glikoz tespiti için ilk ticari biyosensör 1970'lerde üretildiğinden beri, çeşitli biyosensör ürünleri dünya çapında 150'den fazla firma tarafından geliştirilmiş ve ticari sunuma dönüştürülmüştür. 2003 yılında biyosensörler 7,3 milyar dolarlık bir pazara sahipti [27]. Hatta glikoz biyosensörleri olarak, hala biyosensör pazarının %80'inden fazlasını kapsamakta ve gittikçe daha fazla biyosensör, tarımsal üretim, gıda işleme, ve çevresel izleme alanlarında kullanılmaktadır. Çoğu otomatik biyosensör, ister masa üstü, ister taşınabilir tipte olsun, piyasada bulunabilmektedir. Yellow Springs Instruments [163] firması tarafından piyasaya sürülen enzim-esaslı elektrokimyasal sensörler, örneğin, YSI 2700 SELECT, gıda analizinde, glikoz, sucrose, laktoz, laktat, glutamate, galactose, choline, etanol vb ölçümü için geniş çaplı kullanılmaktadır. Biacore [164] tarafından geliştirilen, hassas şekilde örneği ve tampon çözeltiyi kontrol etmek için mikroakışkan kartuşlarıyla (IFC, Integrated Microfluidics Cartridges) entegre edilen SPR biyosensörleri, patojenik bakterilerde dahil hem kimyasal ve hem biyolojik etken maddeleri tespit edebilmektedir.

Biacore Q, özellikle gıda güvenliği ve kalitesi için tasarlanmıştır. Research International [165] firmasına ait, mikroakışkan tabanlı taşınabilir RAPTOR fiber optik biyosensörler toksinleri, kimyasalları, bakterileri ve virüsleri tespit edebilmektedir. Bunlar, bakteri türleri ve örneklerin tiplerine de bağlı olarak, toksinler ve bakterileri 1 ng/mL ve 100 cfu/mL'e kadar düşük seviyelerde tespit edebilmektedir. Çeşitli mikrobiyal BOD biyosensör sistemleri (BOD-2000 by Nisshin Electric Co., Tokyo, Japan; BODypoint by Aucoteam GmbH, Berlin, Germany; BSBmodul by Prüfgeräte-Medingen GmbH, Dresden, Germany; ve ARAS by Dr. Lange GmbH, Berlin, Germany), atık su ve çevresel kontrol süreçlerinde kullanılmaktadır. Bu BOD biyosensörlerin büyük çoğunluğu, sürekli akış düzeneği amper-metrik oksijen transdüserlerini temel almıştır. Bunlara ilaveten ticari optik

biyosensörler, Baird ve Myszka [166] ve Rich ve Myszka [167] tarafından değerlendirilmeye alınmıştır.

Seçilen biyosensör üreticileri, enstrümanları ve iletişim bilgileri Tablo 3'te özetlenmiştir. Birçok biyosensör araştırma prototipi, henüz piyasada bulunmadıklarından burada listelenmemiştir.

Tablo 3. Biyosensör üreticileri, ekipmanlarından bir seçme ve iletişim bilgileri.

Üretici	Cihaz	Kontakt
<i>Elektrokimyasal biyosensörler</i>		
Analox Instruments	Analyzer LM5, Am2, Gm10, GM7	analox.com
Aucoteam GmbH	BODypoint	Berlin, Germany
BioFutura S.r.l	PerBaco 2000, PeBaco 2002	biofutura.com
Biosensori SpA	Midas Pro	Genoa, Italy
BioSensor Technology GmbH	Thick Film Biosensor	bst-biosensor.de
Biomerieux	Bactometer 64/128, M128	biomerieux-usa.com
Biotech Products	Micro Dialysis Biosensors by Sycopel	biotechproducts.com
Dr. Lange GmbH	ARAS	Berlin, Germany
EKF Diagnostic GmbH	Biosen 5020, 5040, 6020	ekf-diagnostic.de
Flownamics Analytical Instruments	FAIZA 110-P	flownamics.com
Gwent Sensors Ltd	The Answer 8000	g-s-l.co.uk
IBA GmbH	OLGA, on-Line General Analyzer	iba-go.de
Ismatec S.A.	ASIA FIA	ismatec.com
Malthus	Malthus 2000	Crawley, UK
Nisshin Electric Co.	BOD-2000	Japan
Nova Biomedical	Bio Profile Chemistry Analyzer	novabiomedical.com
Oriental Electric Co.	Fresh Meter KV-101	Japan
Prüfgeräte Medingen GmbH	BSBmodule	Dresden, Germany
SensAlyse Ltd	Alcohol Sensor	sensanalyse.com
Toyo Jozo	PM-1000, PM-1000DC, M-100, AZ-200 Analyzers	Shizuoka, Japan
TRACE Biotech AG	Process TRACE 1.2	trace-ag.de
Universal Sensors	ABD 3000	intel.ucc.ie/sensors/universal/
Yellow Springs Instruments	YSI 2300, YSI 2700 SELECT	ysi.com
<i>Optik biyosensörler</i>		
Analytical μ -Systems	BIO-Suplar 2	micro-systems.de
Affinity Sensors	IASys, IAsys Plus, IAsys Auto+	affinity-sensors.com
AVIV Instruments	PWR Model 400	avivins.com
Biacore AB	Biacore 1000, 2000, 3000, X, J, Quant	biacore.com
Farfield Sensors Ltd	AnaLight Bio250	farfield-sensors.co.uk
Graffinity	Plasmon Imager	graffinity.com
HTS Biosystems	SPR array	htsbiosystems.com
IBIS Technologies	IBIS I, IBIS II	ibis-spr.nl
Nippon Laser Electronics	SPR670, SPR. Cella	nle-lab.co.jp
Prolinx	OCTAVE	prolinxinc.com
Quantech Ltd	FarTraQ SPR Array	quantechltd.com
Research International	RAPTOR	resrchintl.com
SRU Biosystems	BIND	srubiosystems.com
Texas Instruments	Spreeta	ti.com
ThreeFold Sensors	HH01 BioSensor Fluorometer	threefoldsensors.com
<i>Piezoelektrik cihazlar</i>		
CH Instruments	EQCM 400 Electrochemical QCM	chinstruments.com
Elchema	EQCN-700 and EQCN-900 QCM	elchema.com
Maxtek	PM-700 Series	maxtek.com
Princeton Applied Research	QCA-917, QCA-922 QC Analyzers	princetonappliedresearch.com

(devami)

QCM Research	Mark Series Cryogenic QCM, and Thermoelectric Piezoelectric Detector	qcmresearch.com
Universal Sensors	PZ-105 Gas Phase Piezoelectric Detector, PZ-1000 Immunobiosensor	intel.ucc.ie/sensors/universal/
<i>Termal sensörler</i>		
Minco	Termistörler ve termometreler	minco.com
Thermal Metric	Termal aktivite monitörler	UK
Thermometric	Termistör, termistör sensörler, termoprobalar	thermometric.com
Yellow Springs Instruments	Termistör, termoprobalar, termometreler	ysi.com

Bazı raporlar [27,167], kitaplar [147] ve derleme makaleleri [149, 166,168] ticari biyosensör ürünleri ve bunların pazarları hakkında kapsamlı bilgiler vermektedir.

Yeni biyosensörlerin geliştirilmesinde, aynı zamanda büyük bir engeli oluşturan iki büyük ihtiyaç bulunmaktadır. Bunlardan biri ultra küçük boyut ve diğeri ultra yüksek hassasiyettir [14]. MEMS, biyoMEMS, NEMS ve mikroakışkan teknolojileri, biyosensörlerin pompalar, vanalar, reaktörler, ayırıştırıcılar, dedektörler, kontrolörler vb ile çipler veya bir dizilim içinde bütünleştirilmelerini mümkün kılmıştır [124,135]. Nanotüpler, nanokablolar, nanofiberler ve nanopartiküller gibi nanomateryaller, Kohli ve ark. [169], Chen ve ark. [170], Li ve ark. [171] ve Seydack [172], derlemelerinde olduğu gibi biyosensörlere uygulanmıştır. Aynı zamanda üzerlerinde mühendislik çalışmaları yapılmış biyoalgılama materyallerinin, biyosensörlerin gelişiminde önemli rol oynayacaklarını, bunun tekil moleküllerin tespitine imkân sağlayacağını belirtmişlerdir. Bu gelişmiş teknolojiler biyosensörlerle bütünleştikçe, biyosensörlerin tarım, gıda ve çevre alanlarında, biyolojik ve kimyasal etken maddelerin hızlı, belirli, hassas, düşük maliyetli, sahada, çevrim içi ve/veya gerçek zamanlı tespiti gerçekleşmiş olacaktır.

Teşekkürler

Yazar, Arkansas Üniversitesi, Biyosensörler ve Biyo Donanım laboratuvarında çalışan tüm araştırmalarda bulunan meslektaşlarına, araştırma görevlilerine, asistanlara ve yükseköğrenim öğrencilerine bu çalışmanın hazırlanmasında sağladıkları bilgi ve veriler için teşekkür eder.

Kaynaklar

1. Turner, A. P. F., I. Karube, and G. S. Wilson. 1987. Biosensors Fundamentals and Applications. Oxford, UK: Oxford University Press.
2. Datta, A. K. 1990. Novel chemical and biological sensors for monitoring and control of food processing operations. J. Food Eng. 12: 223-238.
3. Coulet, P. R. 1991. What is a biosensor? Biosensor Principles and Applications. L. J. C. Blum, ed. New York, NY: Marcel Dekker.
4. Wangner, G., and G. G. Guibault, eds. 1994. Food Biosensor Analysis. New York, NY: Marcel Dekker.

5. Clark, Jr. L. C., and C. Lyons. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 105: 20-45.
6. Guilbault, G. G., and J. Montalvo. 1969. Urea-specific enzyme electrode. *JACS* 91: 2164-2569.
7. Scheller, W., R. Hinstche, D. Pfeiffer, F. Schubert, and R. Kindservater. 1991. Biosensors: Fundamentals, applications and trends. *Sensors Actuators B4*: 197 - 206.
8. Turner, A. P. F. 1989. Current trends in biosensor research and development. *Sensors Actuators* 17: 433-450.
9. Griffiths, D., and G. Hall. 1993. Biosensors - What real progress is being made? *Trends Biotechnol.* 11: 122-130.
10. Gizeli, E., and C. R. Lowe. 1996. Immunosensors. *Current Opinion Biotechnol.* 7: 66-71.
11. Powner, E. T., and F. Yalcinkaya. 1997. Intelligent Biosensors. *Sensor Review* 17(2): 107-116.
12. Rogers, K. R., and M. Mascini. 1998. Biosensors for field analytical monitoring. *Field Anal. Chem. Technol.* 2: 317-331.
13. Janshoff, A., H.-J. Galla, and G. Steinem. 2000. Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors? *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 4004-4032.
14. Nakamura, H., and I. Karube. 2003. Current research activity in biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 377: 446-468.
15. Kissinger, P. T. 2005. Biosensors—A perspective. *Biosens. Bioelectron.* 20(12): 2521-2516.
16. Marquette, C. A., and L. J. Blum. 2006. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens. Bioelectron.* 21: 1424-1433.
17. Cass, E. A. G., ed. 1990. *Biosensors: A Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press.
18. Hall, E. A. H. 1991. *Biosensors*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
19. Buerk, D. G. 1993. *Biosensors: Theory and Applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing.
20. Eggins, B. 1996. *Biosensors: An Introduction*. New York, NY: John Wiley & Sons.
21. Taylor, R., and J. Schultz. 1996. *Handbook of Chemical and Biological Sensors*. Philadelphia, PA: IOP Publishing.
22. Kress-Rogers, E. 1997. *Handbook of Biosensors and Electronic Noses*. Boca Raton, FL: CRC Press.
23. Cunningham, A. 1998. *Introduction to Bioanalytical Sensors*. New York, NY: John Wiley & Sons.
24. Yang, V. C., and T. T. Ngo, eds. 2000. *Biosensors and Their Applications*. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
25. Sadana, A. 2001. *Engineering Biosensors: Kinetics and Design Applications*. London, UK: Academic Press.
26. Gizeli, E., and C. R. Lowe, eds. 2002. *Biomolecular Sensors*. London, UK: Taylor & Francis.
27. Newman, J. D., L. J. Tigwell, A. P. F. Turner, and P. J. Warner. 2004. *Biosensors: A Clearer View*. Cranfield, UK: Cranfield University.
28. Stryer, L. 1988. *Biochemistry*. New York, NY: W. H. Freeman.
29. Bilitewski, U, W. Drewes, J. Neermann, J. Schrader, R. Surkow, R. D. Schmid, and J. Bradley. 1993. Comparison of different biosensor systems suitable for bioprocess monitoring. *J. Biotechnol.* 31: 257-266.
30. Jenkins, D. M., and M. J. Delwiche. 2002. Manometric biosensor for on-line measurement of milk urea. *Biosens. Bioelectron.* 17: 557-563.

31. Bilitewski, U. M. Genrich, S. Kadow, and G. Mersal. 2003. Biochemical analysis with microfluidic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 377: 556-569.
32. Soldatkin, A. P., V. N. Arkhypova, S. V. Dzyadevch, A. V. El'skaya, J.-M. Gravouelle, N. Jaffrezic-Renault, and C. Martelet. 2005. Analysis of potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs. *Talanta* 66: 28-33.
33. Stanier, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis, and R. P. Painter. 1986. *The Microbial World*. 5th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
34. Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 1989. *Immunology*. London, UK: Elsevier Science Health Science Div.
35. Delwiche, M., X. Tang, R. BonDurant, and C. Munro. 2001. Improved biosensor for measurement of progesterone in bovine milk. *Trans. ASAE* 44: 1997-2002.
36. Sanaikone, K., M. J. Delwiche, R. H. BonDurant, and C. J. Munro. 2004. Quantitative lateral flow immunoassay for measuring progesterone in bovine milk. *Trans. ASAE* 47: 1357-1365.
37. Su, X. L., and Y. Li. 2004. A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens. Bioelectron.* 19(6): 563-574.
38. Tschmelak, J., G. Proll, and G. Gauglitz. 2005. Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example. *Talanta* 65: 313-323.
39. Rajendran, M., and A. D. Ellington. 2002. Chapter 12: Nucleic acids for reagentless biosensors. *Optical Biosensors—Present & Future*, 369-396. F. S. Ligler, and C. A. R. Taitt, eds. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
40. Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini. 2005. Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron.* 20: 2424-2434.
41. Chan, S. D. H., K. Dill, J. Blomdahl, and H. G. Wada. 1996. Non-isotopic quantitation of mRNA using a novel RNase protection assay. Measurements of erb-2 mRNA in tumor cell lines. *Anal. Biochem.* 242: 214-220.
42. Kai, E., S. Sawata, K. Ikebukuro, T. Lida, T. Honda, and I. Karube. 1999. Detection of PCR products in solution using surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* 71: 796-800.
43. McCauley, T. G., N. Hamaguchi, and M. Stanton. 2003. Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules. *Anal. Biochem.* 319: 244-250.
44. Kalogianni, D. P., T. Koraki, T. K. Christopoulos, and P. C. Ioannou. 2006. Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms. *Biosens. Bioelectron.* 21: 1069-1076.
45. Zhao, W., S. Yao, and I.-M. Hsing. 2006. A microsystem compatible strategy for viable *Escherichia coli* detection. *Biosens. Bioelectron.* 21: 1163-1170.
46. Davis, C. 1975. *Annals Microbiol.* 126A: 175-186.
47. Karube, and Suzuki. 1990. Microbial biosensors. *Biosensors: A Practical Approach*, 155-170. A. E. G. Cass, ed. Oxford, UK: Oxford University Press.
48. Rack, J. 1995. *Cell-Based Biosensor*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co.
49. Chang, I. S., J. K. Jang, G. C. Gil, M. Kim, H. J. Kim, B. W. Cho, and B. H. Kim. 2004. Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 19: 607-613.
50. Goto, M., K. Sato, A. Murakami, M. Tokeshi, and T. Kitamori. 2005. Development of a microchip-based bioassay system using cultured cells. *Anal. Chem.* 77: 2125-2131.
51. Kumar, J., S. K. Jha, and S. F. D'Souza. 2006. Optical microbial biosensor for detection of methyl parathion pesticide using *Flavobacterium* sp. whole cells adsorbed on glass fiber filters as disposable biocomponent. *Biosens. Bioelectron.* 21: 2100-5. Available at: www.sicencedirect.com.

52. Bousse, L. 1996. Whole cell biosensors. *Sensors Actuators B*34: 270-275.
53. D'Souza, S. F. 2001. Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 16: 337-353.
54. Mello, L. D., and L. T. Kubota. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* 77: 237-256.
55. Rechnitz, G. A. 1978. Biochemical electrodes uses tissues slice. *Chem. Eng. News* 56: 16-21.
56. Wijesuriya, D. C., and G. A. Rechnitz. 1993. Biosensors based on plant and animal tissues. *Biosens. Bioelectron.* 8: 155-60.
57. Sezginurk, M. K., and E. Dinckaya. 2005. Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based plant tissue homogenate. *Talanta* 65: 998-1002.
58. Wu, F., Y. Huang, and C. Huang. 2005. Chemiluminescence biosensor system for lactic acid using natural animal tissue as recognition element. *Biosens. Bioelectron.* 21: 518-522.
59. Topcu, S., M. K. Sezginurk, and E. Dinckaya. 2004. Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: Investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosens. Bioelectron.* 20: 592-597.
60. Heinemann, W. R., C. W. Anderson, and H. B. Halsall. 1979. Immunoassay by differential pulse polarography. *Sci. Wash.* 204: 865-866.
61. Niculescu, M., C. Nistor, I. Frebort, P. Pec, B. Mattiasson, and E. Csoregi. 2000. Redox hidrogel-based amperometric bienzyme electrode for fish freshness monitoring. *Anal. Chem.* 72: 1591-1597.
62. Ruan, C. M., H. Wang, and Y. Li. 2002. A bienzyme electrochemical biosensor coupled with immunomagnetic separation for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. *Trans. ASAE* 45(1): 249-255.
63. Liu, G., and Y. Lin. 2006. Biosensor based on self-assembling acetylcholinesterase on carbon nanotubes for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides. *Anal. Chem.* 78: 835-843.
64. Bergveld, P. 1970. Development of an ion sensitive solid state device for neurophysiological measurements. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 17: 70-71.
65. Panfili, P. R., K. Dill, and J. D. Olson. 1994. Immunochemical detection using the light-addressable potentiometric sensor. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 60-64.
66. Dill, K., J. H. Song, J. A. Blomdahl, and J. D. Olson. 1997. Rapid, sensitive and specific detection of whole cells and spores using the light-addressable potentiometric sensor. *J. Biochem. Biophys. Methods* 34: 161-166.
67. Tu, S., J. Uknalis, and P. L. Irwin. 2002. The capture of *Escherichia coli* O157:H7 for light addressable potentiometric sensor (LAPS) using two different types of magnetic beads. *J. Rapid Meths. Automat. Microbiol.* 10: 185-195.
68. Mourzina, G., E. Ermolenko, T. Yoshinobu, Y. Vlasov, H. Iwasaki, and M. J. Schöning. 2003. Anion-selective light-addressable potentiometric sensors (LAPS) for the determination of nitrate and sulphate ions. *Sensors Actuators B*91:32.
69. Keusgen, M., J. P. Klock, D. T. Knobbe, M. Jünger, I. Krest, M. Goldbach, W. Klein, and M. J. Schöning. 2004. Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors. *Sensors Actuators B*103: 380-385.
70. Ivnitski, D., I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins, and S. Stricker. 2000. Review: Applications of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanal.* 12(5): 317-325.
71. Shah, J., and E. Wilkins. 2003. Electrochemical biosensors for detection of biological warfare agents. *Electroanal.* 15: 157-167.
72. Bakker, E. 2004. Electrochemical sensors. *Anal. Chem.* 76: 3285-3298.
73. Watson, L. D., P. Maynard, D. C. Cullen, R. S. Sethi, J. Brettle, and C. R. Lowe. 1988. A microelectronic conductimetric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 3: 101-115.

74. Gómez, R., R. Bashir, A. Sarikaya, M. R. Ladisch, J. Sturgis, J. P. Robinson, T. Geng, A. K. Bhunia, H. L. Apple, and S. Wereley. 2001. Microfluidic biochip for impedance spectroscopy of biological species. *Biomed. Microdevices* 3: 201-209.
75. Radke, S., and E. C. Alocilja. 2005. A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosens. Bioelectron.* 20: 1662-1667.
76. Yang, L., Y. Li, and G. Erf. 2004. Interdigitated array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Chem.* 76(4): 1107-1113.
77. Yang, L., and Y. Li. 2005a. AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrodes and their capture of *E. coli* O157:H7. *Biosens. Bioelectron.* 20(7): 1407-1416.
78. Louie, A. S., I. G. Marenchic, and R. H. Whelan. 1998. A fieldable modular biosensor for use in detection of foodborne pathogens. *Field Anal. Chem. Tech.* 2: 371-377.
79. Schöning, M. J., M. Arzdorff, P. Mulchandani, W. Chen, and A. Mulchandani. 2003. A capacitive field-effect sensor for the direct determination of organophosphorus pesticides. *Sensors Actuators B*91: 92-97.
80. Anh, T. M., S. V. Dzyadevych, M. C. Van, N. J. Renault, C. N. Duc, and J.-M. Chovelon. 2004. Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites. *Talanta* 63: 365-370.
81. Berggren, C., B. Bjarnason, and G. Johansson. 2001. Capacitive biosensors. *Electroanal.* 13: 173-180.
82. Katz, E., and I. Willner. 2003. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanal.* 15: 913-945.
83. Liley, M. 2002. Chapter 6: Optical transducers. *Biomolecular Sensors*, 121-175. E. Gizeli, and C. R. Lowe, eds. London, UK: Taylor & Francis.
84. Delwiche, M., E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe, J. De Baerdemaeker, E. Decuypere, and W. Sansen. 2000. A biosensor to detect penicillin residues in food. *Trans. ASAE* 43: 153-159.
85. Liu, Y., and Y. Li. 2002. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. *J. Microbiol. Methods* 51(3):369-377.
86. Capitan-Vallvey, L. F., E. Arroyo-Guerrero, M. D. Fernandez-Ramos, and F. Santoyo-Gonzalez. 2005. Disposable receptor-based optical sensor for nitrate. *Anal. Chem.* 77: 4459-4466.
87. Blum, L. J., S. M. Gautier, and P. R. Coulet. 1994. Chapter 5: Fiber-optic biosensors based on luminometric detection. *Food Biosensor Analysis*, 101-121. Wangner and Guibault, eds. New York, NY: Marcel Dekker.
88. Blum, L. J., and P. R. Coulet. 2000. Chapter 12: Luminescent biosensors. *Biosensors and Their Applications*, 213-222. V. C. Yang, and T. T. Ngo, eds. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
89. Kim, B. C., and M. B. Gu. 2003. A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification. *Biosens. Bioelectron.* 18: 1015-1021.
90. Liu, Y., J. Ye, and Y. Li. 2003. Rapid detection of *E. coli* O157:H7 in ground beef, chicken carcass and lettuce samples with an immunomagnetic chemiluminescence fiber-optic biosensor. *J. Food Prot.* 66(3): 512-517.
91. Tu, S., A. G. Gehring, and P. L. Irwin. 2005. Bioenergetic confirmation of viable pathogens in foods by atp-bioluminescence. *Luminescence* 15: 445-448.
92. Taitt, C. R., G. P. Anderson, and F. S. Ligler. 2005. Evanescent wave fluorescence biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 20(12): 2470-2487.
93. Barzen, C., A. Brecht, and G. Gauglitz. 2002. Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control. *Biosens. Bioelectron.* 17: 289-295.

94. Goh, Y. Y., V. Frecer, B. Ho, and J. L. Ding. 2002. Rational design of green fluorescent protein mutants as biosensor for bacterial endotoxin. *Protein Engr.* 15: 493-502.
95. Yang, L., and Y. Li. 2005b. Quantum dots as fluorescent labels for quantitative detection of *Salmonella typhimurium* in chicken carcass wash water. *J. Food Prot.* 68(6): 1241-1245.
96. Pickup, J. C., F. Hussain, N. D. Evans, O. J. Rolinski, and D. J. S. Birch. 2005. Fluorescence-based glucose sensors. *Biosens. Bioelectron.* 20: 2555-2565.
97. Hahn, K., and A. Toutchkine. 2002. Live-cell fluorescent biosensors for activated signaling proteins. *Current Opinion Cell Biol.* 14: 167-172.
98. Glaser, R. W. 2000. Surface plasmon resonance biosensors. *Biosensors and Their Applications*, 195-212. V. C. Yang, and T. T. Ngo, eds. New York, N.Y.: Kluwer Academic.
99. Rich, R. L., and D. G. Myszka. 2004. Why you should be using more SPR biosensors technology. *Drug Discovery Today: Tech.* 1: 301-308.
100. Meeusen, C. A., E. C. Alocilja, and W. N. Osburn. 2005. Detection of *E. coli* O157:H7 using a miniaturized surface plasmon resonance biosensor. *Trans. ASABE* 48(6): 2409-2416.
101. Dumont, V., A.-C. Huet, I. Traynor, C. Elliott, and P. Delahaut. 2006. An SPR biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps. *Anal. Chim. Acta* (in press).
102. Robinson, G. R., J. W. Attridge, J. K. Deacon, and S. C. Whiteley. 1993. The fluorescent capillary device. *Sensors Actuators B* 11: 235-238.
103. Cush, R., J. M. Cronin, W. J. Stewart, C. H. Maul, J. Molloy, and N. J. Goddard. 1993. The resonance mirror: A novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: Principle of operation and associated instrumentation. *Biosens. Bioelectron.* 8: 347-353.
104. Ligler, F. S., and C. A. R. Taitt. 2002. *Optical Biosensors - Present & Future*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
105. Thompson, R. B., ed. 2006. *Fluorescence Sensors and Biosensors*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
106. Shons, A., F. Dorman, and J. Najarian. 1972. The piezoelectric quartz immunosensor, *J. Biomed. Mater. Res.* 6: 565-570.
107. Su, X. D., S. F. Y. Li, J. Kwang, and S. Low. 2000. Piezoelectric quartz crystal based screening test for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs. *Anal. Chem.* 125: 725-730.
108. Berkenpas, E., P. Millard, and M. Cunha. 2005. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with langasite pure shear horizontal surface acoustic wave sensor. *Biosens. Bioelectron.* (in press).
109. Su, X. L., and Y. Li. 2005. A QCM immunosensor for *Salmonella* detection with simultaneous measurement of resonant frequency and motional resistance. *Biosens. Bioelectron.* 21(6): 840-848.
110. Ward, M. D., and D. A. Buttry. 1990. In situ interfacial mass detection with piezoelectric transducers. *Science* 249: 1000-1007.
111. Buttry, D. A., and M. D. Ward. 1992. Measurement of interfacial process at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance. *Chem. Rev.* 92(6): 1355-1379.
112. Suleiman, A. A., and G. G. Guilbault. 1994. Recent developments in piezoelectric immunosensors: A review. *Analyst* 119: 2279-2282.
113. Bunde, R. L., E. J. Jarvi, and J. J. Rosentreter. 1998. Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta* 46: 1223-1236.

114. Marx, K. A. 2003. Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules* 4(5): 1099-1120.
115. Buck, R. P., E. Lindner, W. Kutner, and A. G. Inzelt. 2004. Piezoelectric chemical sensors. *Pure Appl. Chem.* 76(6): 1139-1160.
116. Kroger, S., and B. Danielsson. 1997. Chapter 13: Calorimetric biosensors. *Handbook of Biosensors and Electronic Noses—Medicine, Food, and the Environment*, 279-298. E. Kress-Rogers, ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
117. Danielsson, B., and K. Mosbach. 1987. Chapter 29: Theory and application of calorimetric sensors. *Biosensors: Fundamentals and Applications*, 575-597. A. P. F. Turner, I. Karube and G. S. Wilson, eds. Oxford, UK: Oxford University Press.
118. Lammers, F., and T. Scheper. 1999. Thermal biosensors in biotechnology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 64: 35-67.
119. Ramanathan, K., and B. Danielsson. 2001. Principles and applications of thermal biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 16: 417-423.
120. Ramanathan, K., B. R. Jönsson, and B. Danielsson. 2001. Sol-gel based thermal biosensor for glucose. *Anal. Chimica Acta* 19: 1-10.
121. Zheng, Y.-H., T.-C. Hua, D.-W. Sun, J.-J. Xiao, F. Xu, and F.-F. Wang. 2006. Detection of dichlorvos residue by flow injection calorimetric biosensor based on immobilized chicken liver esterase. *J. Food Engr.* 74: 24-29.
122. Megens, M., and M. Prins. 2005. Magnetic biochips: A new option for sensitive diagnostics. *J. Magnet. Magnet. Materials* 293: 702-708.
123. Varshney, M., B. Srinivasan, S. Tung, and Y. Li. 2005a. Microfluidic filter chip based chemiluminescence filter optic biosensing method for the detection of *E. coli* O157:H7. ASABE Paper No. 057028. St. Joseph, MI: American Society of Agricultural and Biological Engineers.
124. Pamme, N. 2006. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip* 6: 24-38.
125. Mayes, A. G. 2002. Chapter 4: Immobilization chemistry of biological recognition molecules. *Biomolecular Sensors*, 49-86. E. Gizeli, and C. R. Lowe, eds. London, UK: Taylor & Frances.
126. Dubrovsky, T., A. Tronin, S. V. Dubrovskaya, and C. Nicolini. 1995. Immunological activity of IgG Langmuir films oriented by protein A layer. *Sensors Actuators B*23: 1-7.
127. Anzai, J.-I., T. Hoshi, and T. Osa. 2000. Chapter 3: Avidin-biotin mediated biosensors. *Biosensors and Their Applications*, 35-46. V. G. Yang, and T. T. Ngo, eds. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
128. Duschl, C. 2002. Chapter 5: Binding isotherms and kinetics of immobilized biological systems. *Biomolecular Sensors*, 87-120. E. Gizeli, and C. R. Lowe, eds. London, UK: Taylor & Frances.
129. Gijs, M. A. M. 2004. Magnetic bead handling on-chip: New opportunities for analytical applications (review). *Microfluidics Nanofluidics* 1: 22-40.
130. Tibbe, A. G. J., B. G. de Grooth, J. Greve, G. J. Dolan, C. Rao, and L. W. M. M. Terstappen. 2002. Magnetic field design for selecting and aligning immunomagnetic labeled cells. *Cytometry* 47: 163-172.
131. Varshney, M., L. Yang, X. Su, and Y. Li. 2005b. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Food Prot.* 68: 1804-1811.
132. Deshpande, S. S. 1996. *Enzyme Immunoassays—From Concept to Product Development*. New York, NY: Chapman & Hall.
133. Schwarz, M. A., and P. C. Hauser. 2001. Recent development in detection methods for microfabricated analytical devices. *Lab on a Chip* 1: 1-6.

134. Meldrum, D. R., and M. R. Holl. 2002. Microscale bioanalytical systems. *Science* 297: 1197-1198.
135. Bange, A., B. H. Halsall, and W. R. Heinemann. 2005. Review: Microfluidic immunosensor systems. *Biosens. Bioelectron.* 20: 2488-2503.
136. Wang, J., G. Liu, and M. R. Jan. 2004. Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: Carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. *JACS Communicat.* 126: 3010-3011.
137. Simonian, A. L., T. A. Good, S.-S. Wang, and J. R. Wild. 2005. Nanoparticlebased optical biosensors for the direct detection of organophosphate chemical warfare agents and pesticides. *Anal. Chim. Acta* 534: 69-77.
138. Ren, X., X. Meng, D. Chen, F. Tang, and J. Jiao. 2005. Using silver nanoparticles to enhance current response of biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 21: 433-437.
139. Davis, J., D. H. Vaughan, and M. F. Cardosi. 1995. Elements of biosensors construction. *Enzyme Microbial Tech.* 17: 1030-1035.
140. Zhang, S., G. Wright, and Y. Yang. 2000. Materials and techniques for electrochemical biosensors design and construction. *Biosens. Bioelectron.* 15: 273-282.
141. Wong, R. B. 2000. Chapter 16: Biosensors for agrochemicals. *Biosensors and Their Applications*, 283-298. V. G. Yand, and T. T. Ngo, eds. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
142. Kindschy, L. M., and E. C. Alocilja. 2004. A review of molecularly imprinted polymers for biosensor development for food and agricultural applications. *Trans. ASAE* 47: 1375-1382.
143. Deshpande, S. S., and R. M. Rocco. 1994. Biosensors and their potential use in food quality control. *Food Technol.* 48(6): 146-150.
144. Scott, A. O., ed. 1998. *Biosensors for Food Analysis*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
145. Prodromidis, M. I., and M. I. Karayannis. 2002. Enzyme based amperometric biosensors for food analysis. *Electroanal.* 14(4): 241-261.
146. Amine, A., H. Mohammadi, I. Bourais, and G. Palleschi. 2006. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 21: 1405-1423.
147. Ramsay, G., ed. 1998. *Commercial Biosensors—Applications to Clinical, Bioprocess, and Environmental Samples*. New York, NY: John Wiley & Sons.
148. Bilitewski, U., and A. Turner. 2000. *Biosensors in Environmental Monitoring*. Abingdon, UK: Taylor & Francis Group.
149. Rodriguez-Mozaz, S., M.-P. Marco, M. J. L de Alda, and D. Barcelo. 2004. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Appl. Chem.* 76(4): 723-752.
150. Fielding, M., D. Barcelo, S. Helweg, L. Galassi, L. Torstensson, P. van Zoonen, R. Wolter, and G. Angeletti. 1992. *Pesticides in Ground and Drinking Water, Water Pollution*. Research Report No. 27, Commission of the European Communities, Brussels.
151. Velasco-Garcia, M. N., and T. Mottram. 2003. Biosensors technology addressing agricultural problems. *Biosystem Engr.* 84: 1-12.
152. Trojanowicz, M., and M. Hitchman. 1996. Determination of pesticides using electrochemical biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* 15: 38-45.
153. Trojanowicz, M. 2002. Determination of pesticides using electrochemical enzymatic biosensors. *Electroanal.* 14: 19-20.
154. Tom-Moy, M., R. L. Baer, D. Solomon, and T. P. Doherty. 1995. Atrazine measurements using surface transverse wave device. *Anal. Chem.* 67: 1510-1516.

155. Patel, P. D. 2002. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: A review. *TrAC Trends Anal. Chem.* 21: 96-115.
156. Ivnitski, D., I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, and E. Wilkins. 1999. Review: Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 14: 599-624.
157. Leonard, P. S. Hearly, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty, and R. O'Kennedy. 2003. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme Microbial Tech.* 32: 3-13.
158. Deisingh, A. K., and M. Thompson. 2004. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *J. Appl. Microbiol.* 96: 419-429.
159. Dennison, M. J., and A. P. F. Turner. 1995. Biosensors for environmental monitoring. *Biotech Adv.* 13: 1-12.
160. Wang, J., G. Rivas, and X. Cai. 1997. DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Anal. Chim. Acta* 347: 1-8.
161. Karube, I., and Y. Nomura. 2000. Enzyme sensors for environmental analysis. *J. Molecul. Catalysis B*10: 177-181.
162. Suri, C. R., M. Raje, and G. C. Varshney. 2002. Immunosensors for pesticide analysis: Antibody production and sensors development. *Critical Reviews in Biotech.* 22: 15-32.
163. Yellow Springs Instruments. 2005. YSI 2700 SELECT. Available at: www.ysi.com. Accessed December 2005.
164. BIACORE. 2005. An introduction to Biacore's SPR technology. Available at: www.biacore.com. Accessed October 2005.
165. Research International. 2005. RAPTOR biosensor. Available at: www.resrchintl.com/raptor.html. Accessed October 2005.
166. Baird, C., and D. G. Myszka. 2001. Current and emerging commercial optical biosensors. *J. Mol. Recognit.* 14: 261-268.
167. Rich, R. L., and D. G. Myszka. 2002. Review: A survey of the year 2002 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 16: 351-382.
168. Robinson, G. A. 1991. Optical immunosensing systems—Meeting the market needs. *Biosens. Bioelectron.* 6: 183-191.
169. Kohli, P., M. Wirtz, and C. R. Martin. 2004. Nanotubes membrane based biosensors. *Electroanal.* 16: 9-18.
170. Chen, J., Y. Mao, N. He, X. Wu, and S. Li. 2004. Nanotechnology and biosensors. *Biotech Adv.* 22: 505-518.
171. Li, J., J. E. Koehne, A. M. Cassell, H. Chen, H. T. Ng, Q. Ye, W. Fan, J. Han, and M. Meyyappan. 2005. Inlaid multi-walled carbon nanotube nanoelectrode arrays for electroanalysis. *Electroanal.* 17: 15-27.
172. Seydack, M. 2005. Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods. *Biosens. Bioelectron.* 20(12): 2425-2469.