

Biyosensörler: Sınıflandırma, Temel Bilgiler ve Karakterizasyon

Yaşar ŞENTÜRK, Ömer Faruk KOÇAL, Batukan BELTEKİN,
Faruk BASTIKOĞLU, Özge TÜZÜN ÖZMEN, Özgün UZ

Özet

Bu kitap bölümü okuyuculara biyosensörler hakkında genel bir bilgi sunmayı ve bu teknolojinin sınıflandırma, karakterizasyon ve pratik uygulamalardaki önemini vurgulamayı amaçlamaktadır. Biyosensörler literatürde biyolojik analitlerin varlığını tespit etmek için kullanılan cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörler çeşitli sınıflandırmalar altında incelenmiş ve bilgileri sunulmuştur. Bu sınıflandırmalar sayesinde biyosensörlerin çalışma prensipleri ve uygulama alanları vurgulanmıştır. Ardından karakterizasyon yöntemlerine değinilmiştir. Karakterizasyon yöntemleri, biyosensörlerin performansını değerlendirmek için kullanılan yöntemler olarak tanımlanmaktadır. Karakterizasyon yöntemlerinde en sık kullanılan yöntem başlıkları incelenmiştir. Bilgileri verilen sınıflandırma ve karakterizasyon başlıklarından yola çıkılarak üç farklı biyosensör uygulaması ele alınmıştır. Bu uygulamalarda sınıflandırma ve karakterizasyonun pratikteki öneminin vurgulanması amaçlanmaktadır. Örnek uygulamalarda biyosensör teknolojisinin çeşitli alanlarda nasıl kullanılabileceği ve analitlerin tespiti için farklı yaklaşımlar gösterilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Amin Grupları; Analit; Antijen; Biyoelement; Biyosensör; Elektrokimyasal; Elektrot; Empedans; Formaldehit; İmmobilizasyon; Karakterizasyon; Karakterizasyon Yöntemleri; Konfigürasyon; Optik; Sınıflandırma; Polarizasyon; Protein.

Giriş

Biyosensörler, biyolojik ve kimyasal olayların hassas ve hızlı bir şekilde tespit edilmesini sağlayan teknolojik cihazlardır. Bu gelişmiş teknolojiyle birlikte biyosensörler günümüzde kendilerine tıp, gıda, çevre, biyoteknoloji gibi alanlarda yaygın kullanım fırsatı bulmaktadır. Biyosensörlerin kullanımı sayesinde tespit edilecek hedef moleküllerin tespit sürecinde kolaylık sağlanmaktadır.

Biyoelement ve sensör elemanlarının bir araya gelmesiyle meydana gelen biyosensörler; patojenik organizmaların, kanserojen, mutajenik ve toksik kimyasalların saptanması veya biyolojik bir etkinin raporlanması için kullanılan cihazlardır. Reaksiyonlarda istenen analitin algılanmasını sağlamak amacıyla biyosensörler kullanılabilmektedir. Biyosensörleri meydana getiren biyoelement ve sensör elemanları zarf tutma, fiziksel adsorpsiyon, matris tutma ve kovalent bağlanma çeşitleri ile birbirlerine bağlanmaktadır.

Biyosensörlerin sınıflandırılması gerçekleştirilirken iki farklı perspektif dikkate alınmıştır. Bu perspektiflerden ilki sinyal iletim unsurunu diğer perspektif ise biyotanıma unsurunu içermektedir. Bu bahsedilen iki perspektif altında biyosensörlerin türleri sınıflandırılarak sinyal türleri ve kullanım alanları hakkında bilgi sunulmuştur. Ayrıca biyosensörlerin üretimi, kullanımı ve amaçlarına da değinilerek okuyucuya biyosensörler hakkında genel bir bilgi aktarımı hedeflenmektedir. Ek olarak biyosensörlerin karakterizasyonu için yapılan önemli deneyler incelenmiştir.

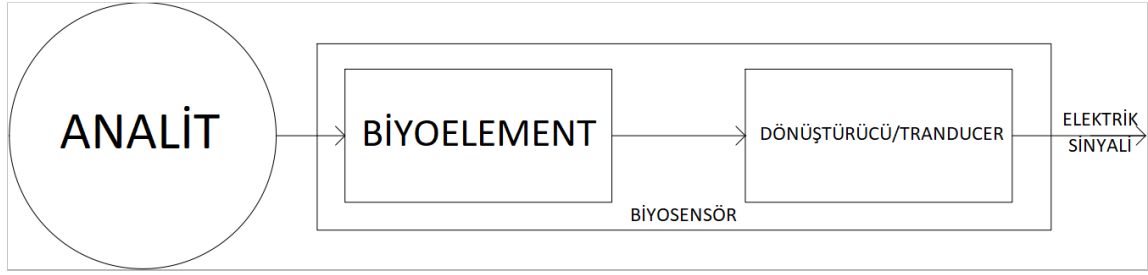
Biyosensörler aracılığı ile gerçekleştirilen çeşitli ölçümler sayesinde karakterizasyon sonuçlarını elde etmek amacıyla gerçekleştirilen çeşitli deneylerde biyosensörlerin performansı değerlendirilebilmektedir. Biyosensör teknolojisi ve uygulamaları hakkında genel bir bakış

sunulması amaçlanmıştır. Biyosensör sınıflandırma ve karakterizasyon hakkında temel bilgiler verilmektedir. Üç deney incelenmiştir. Bu deneyler “Karbon Macunu/Glukoz Oksidaz (CP/GOx) Bazlı Glikoz Biyosensörü İçin Transdüksiyon Yöntemi Olarak Krono Empedans Tekniğinin Değerlendirilmesi”, “Protein Karakterizasyonu İçin Yeni Bir Optik Biyosensör” ve “Formaldehit için Elektrokimyasal Bir Biyosensör”’dür. İlk olarak “Karbon Macunu/Glukoz Oksidaz (CP/GOx) Bazlı Glikoz Biyosensörü İçin Transdüksiyon Yöntemi Olarak Krono Empedans Tekniğinin Değerlendirilmesi” deneyi incelenmiştir. Karbon macunu ve glukoz oksidaz bazlı glikoz biyosensörü elde edilip bu sensör yeni bir transdüksiyon yöntemi olan krono empedans tekniği incelenmiştir. Bunun için alternatif bir voltaj ekleyerek ara yüz empedansını ölçmeyi planlamıştır. İkinci olarak “Protein Karakterizasyonu İçin Yeni Bir Optik Biyosensör” deneyi incelenmiştir. Bu deneyde protein katmanlarının kalınlık gibi özelliklerinin belirlenmesi için optik biyosensör aracılığı ile çift dalga kılavuzu interferometrik tekniğinden faydalanılarak farklı polarizasyonlardaki dağılım farklılığından faydalanılarak katmanların özellikleri gerçek zamanlı olarak belirlenebilmiştir. Son olarak “Formaldehit için Elektrokimyasal Bir Biyosensör” deneyi incelenmiştir. Deneyde formaldehit dehidrogenaz enzimi ve vinilpiridin kullanarak bir biyosensör elde edilmiştir. Bu biyosensör ve akış enjeksiyon sisteminin birleştirilmesiyle oluşan yeni bir tespit yöntemi geliştirilip incelenmiştir.

1. Biyosensörler Hakkında

Analitik ve kimyasal bir algılama cihazı olarak tanımlanan biyosensör teknolojisinin başlangıç tarihi olarak 1962 yılında enzim elektrotlarının geliştirilmesi kabul edilmektedir. Geniş alanlarda yaygın olarak kullanılan biyosensör adlı cihazların kelime kökeni biyoelement ve sensör kelimelerinin birleşiminden ortaya çıkmaktadır. Biyosensörler, sadece belirli bir analiti tanıma özelliğine sahip olan biyoelementler ve bu biyoelementlerde meydana gelen değişiklikleri elektriksel sinyallere dönüştürerek algılanmasını sağlayan sensör elemanlarından meydana gelmektedir. Biyoelementler, analitlere özgü bir şekilde tasarlanmışlardır ve sadece bağlı bulunduğu analiti tanıma yeteneğine sahiptirler ayrıca. Başka analitleri tespit edip tanıyamamaktadırlar. Son teknolojilerin gelişmesiyle sadece tek bir analitin tespiti değil dizi konfigürasyonları gibi çoklu analitik algılama yeteneklerine de sahip olmuşlardır. Kullanılan dönüştürme/transdüksiyon mekanizmasına ve ölçülen parametrelere göre birçok tipte biyosensörler bulunmaktadır. Geniş kullanım alanları bulunan biyosensörler biyomedikal, endüstriyel ve askeri alanlar gibi pazarlarda kendine uygulama alanı bulmaktadır.

Biyosensörler biyoelement ve sensör adlı elemanların birleşiminden oluşmaktadır. Biyoelement canlı hücreler, enzimler gibi biyolojik yapılardan oluşabilir ve sensör elemanı ise elektrik akımı, elektrik potansiyeli vb. gibi algılanabilecek değişimlerin algılanmasını sağlamaktadır. Biyoelement ve sensör elemanlarının unsurları çeşitli kombinasyonlarla bir araya getirilerek yapılacak uygulamaya bağlı olarak farklı biyosensör çeşitlerinin elde edilmesi sağlanmaktadır. Bu kombinasyonlarla ihtiyaç duyulan hassasiyet, sinyal kalitesi gibi faktörlere göre özelleştirilmiş biyosensörler tasarlanabilmektedir. Aşağıdaki şekilde biyosensörlerin şematik bir gösterimi verilmiştir.



Şekil 1. Biyosensörlerin şematik gösterimi

Biyoelement ve sensör elemanları farklı bağlanma yöntemleriyle bir araya gelebilmektedirler. Bu bağlanma şekilleri zarf tutma, fiziksel adsorpsiyon, matris tutma ve kovalent bağlanma şeklinde dört farklı yöntem şeklinde gerçekleşmektedir. Yarı geçirgen bir zarın analit ve biyoelementi ayırmasıyla sensörün biyoelemente bağlanmasının sağlandığı yöntem zarf tutma yöntemi denilmektedir. Biyoelementi, sensör yüzeyine bağlamak amacıyla Van Der Waals, hidrofobik, iyonik kuvvetlerin ve hidrojen bağlarının birlikte kullanıldığı yöntem fiziksel adsorpsiyon yöntemidir. Biyoelementin sensöre bağlanması için biyoelement etrafında gözenekli kapsülasyon matrisi oluşturulmasına gözenekli hapsolme düzeni denilmektedir. Sensör yüzeyinin biyolojik materyaller için reaktif grup olarak işlem gördüğü bağlanma yöntemine kovalent bağlanma yöntemi denilmektedir.

Biyoelement enzim, kimyasal reaksiyonlarda katalizör işlevi görmektedir. Bu biyoelement enzimler kimyasal reaksiyonların sonunda değişmeden kalan büyük bir protein molekülüdür. Enzimler, sadece belirli bir maddeyi başka belirli bir maddeye dönüştürmek için özelleşmiş protein molekülüdür. Sadece bulundukları işleme özeldir. Enzimlerin bu spesifik çalışma prensibi biyosensörlerin çalışma prensibinin temelini oluşturmaktadır.

Biyosensörler, son yıllarda çeşitli tıbbi uygulamalar, patojenik organizma tespiti, biyolojik ve kimyasal analizler gibi alanlarda çok farklı tiplerde ve çeşitlerde geliştirilmiştir. Bu gelişmelerin ana sebebi biyosensörlerin sağladığı birçok avantaj ve uygulama sahasının genişliği olarak nitelendirilebilir. Genel olarak, biyosensörlerin kullanımı numunelerin ön taramasının ilk filtresi olarak kullanılır [1].

2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, tespit edilmek istenen analite, kullanılan biyoelement ve sensör elemanına göre farklı tiplerde olabilmektedir. En yaygın biyosensör tipleri rezonans biyosensörleri, optik biyosensörler, termal algılama biyosensörleri, elektrokimyasal biyosensörler olarak değerlendirilmektedir.

Biyosensörler temel olarak 2 perspektifte incelenmektedir. Aşağıda bu temel kısımlar Sinyal iletim ve biyotanıma başlıkları altında aşağıda incelenmiştir.

2.1. Sinyal İletim

Biyosensörler sinyal iletim unsuru başlığı altında dörde ayrılmaktadır. Bu başlıklar aşağıda değerlendirilmiştir;

2.1.1. Elektrokimyasal

Elektrokimyasal biyosensörler genel olarak üç tipe ayrılmaktadır. Bu üç tip biyosensör aşağıdaki Tablo 1’ de verilmiştir [2].

Tablo 1. Elektrokimyasal biyosensörler

	İletkenlik Ölçen	Amperometrik	Potansiyometrik
Ölçülen Parametre	İletkenlik/Direnç	Akım	Potansiyel/Gerilim
Uygulanan Gerilim	Sinusoidal (AC)	Doğru Akım (DC)	Rampa gerilimi
Hassasiyet	Düşük	Yüksek	Düşük
Matematiksel İfade	Artırımlı Direnç	Cottrell Denklemi	Nerst Denklemi
Üretimi	FET + Enzim	FET + Enzim + 2 elektrot	FET + Enzim + oksit elektrot

İletkenlik ölçen biyosensörler FET+Enzim şeklinde üretilmektedir. Artırımlı direnç şeklinde matematiksel olarak modellenmektedir. Bu tip biyosensörlerde çözeltiye alternatif akım (AC) uygulanmaktadır ve çözeltideki elektriksel değişiklikler meydana gelerek iletkenlik/direnç ölçülmektedir. Amperometrik biyosensörlere doğru akım (DC) uygulanmaktadır ve ölçülen parametre olarak akım değeri kullanılmaktadır. Potansiyometrik biyosensörlerde elektrokimyasal reaksiyonda meydana gelen oksidasyon incelenmektedir. Bunun için çözeltiye rampa gerilimi uygulanmaktadır ve meydana gelen gerilim değişimi ölçülmekte ve reaksiyonun türü incelenmektedir. Elektrokimyasal biyosensörlerden iletkenlik ölçen biyosensörler EEG, EKG, çevre analizi, sanayi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Amperometrik biyosensörler kan şekeri ölçümü, ilaç analizleri, çevre ölçümlerinde kullanılmaktadır. Potansiyometrik biyosensörler pH ölçümü, ilaç analizi, gıda analizi, çevre ölçümü gibi alanlarda kullanılmaktadır. Bu elektrokimyasal biyosensörler uygun maliyetli, taşınabilir, oldukça hassas ve modern mikro fabrikasyon teknolojileriyle uyumludur [3].

2.1.2. Optik

Optik sensörler yüksek tespit hızları, hassasiyetleri, sağlamlıkları ve çoklu analitleri tespit etme yetenekleri ile karakterize edilmektedir [4]. Örneğin, etiketli moleküllere ihtiyaç duymadan bir kimyasalın varlığını belirleyebilen yüzey plazmon rezonansıdır. (Surface Plasmon Resonance-SPR) [5].

Optik biyosensörler tıbbi teşhislerde, gıda maddelerindeki kontaminantları tespit etmek gibi gıda güvenliği görevlerinde, su ve hava numunelerinin incelenmesi, biyoteknoloji ve ilaç geliştirilmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır.

2.1.3. Kütleye Duyarlı Sensörler

Kütleye duyarlı biyosensörler, sıvı, vakum ve hava ortamlarında gerçek zamanlı çalışma ve izleme gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır [6]. Mikro konsol biyosensörler, rezonans sensörler vb. sensörler örnek olarak verilebilir.

Bu örnek verilen sensörlerden rezonans biyosensörü şu şekilde açıklanabilir; Rezonans frekansı değerinin ölçülmesi amacıyla kullanılan akustik dalga transdüseri antikor veya biyoelement ile etkileşime girerek bağlanmaktadır. Analit veya antijen zar(membran) ile etkileşime girip bağlandığında zarın(membran) kütlesi değişmektedir ve bu bağlantı sonucu zarda meydana gelen kütle değişimi transdüserin rezonans frekansını değişime yol açmaktadır. Bu frekans değişimi daha sonra ölçülerek değerlendirilebilmektedir. Kütleye duyarlı biyosensörler ilaç geliştirilmesi, çevresel numunelerdeki kirleticilerin tespiti, çeşitli biyolojik ve kimyasal araştırmalarda kullanılabilmektedir.

2.1.4. Termal/ Termometrik Sensörler

Termal algılama biyosensörleri immobilize edilmiş enzim moleküllerinin sıcaklık sensörleri ile birleştirilmesiyle oluşmaktadır. Termal biyosensörler, sıcaklık değişimlerini algılayarak biyomolekül varlığını algılamak için kullanılmaktadır. Termometrik biyosensörler temelde klinik ve endüstriyel süreçlerin izlenmesi için kullanılmaktadır [7].

2.2. Biyotanıma

Biyosensörler, biyotanıma unsuruna bağlı olarak enzimatik, protein reseptörü tabanlı, immünosensör, DNA biyosensörleri ve tam hücre biyosensörleri olmak üzere 5 temel başlık altında incelenebilmektedir.

2.2.1. Enzimatik

Tespit edilemeyen substratın enzimle katalize edilerek elektrokimyasal olarak ölçülebilir sonuca dönüştürülmesi veya tersi prensibine dayanır [8]. Enzimle katalize edilen birçok reaksiyon, immobilize bir enzime bağlı uygun bir dönüştürücü kullanılarak ölçülebilir bir sonucun (yani O_2 , CO_2 ve iyonlar) salınmasını veya kullanılmasını içermektedir [9]. Enzimatik olaylardan faydalanılarak analit molekülü biyosensör tarafından saptanmaktadır.

Enzimatik biyosensörler endüstriyel süreç izleme, ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi, gıda-içecek endüstrisi gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

2.2.2. Protein Reseptörü Tabanlı

Protein reseptörü bazlı biyosensörler veya katalitik olmayan protein biyosensörleri, hücre zarı proteinlerinin reseptör olarak hareket etme yeteneğine dayanır. Bu reseptörler, bağlanma sinyalinin ya metabotropik reseptörler (yani enzim sekresyonu) ya da iyonotropik reseptörler tarafından zar boyunca iletilmesine izin verir [10]. Hedef analitin tespiti için protein reseptörleri kullanılmaktadır ve biyosensör tarafından saptanmaktadır.

Protein reseptörü tabanlı biyosensörler kanser ve enfeksiyon gibi hastalıkların tespiti, ilaç keşfi ve geliştirilmesi, gıda-tarım endüstrisi gibi alanlarda kullanılmaktadır.

2.2.3. İmmunosensör

İmmunosensörler' in çoğunun yapısı, antijenlerin ve antikorların katı bir destek üzerinde immobilize edildiği katı faz immünolojik testler kavramını kullanmaktadır. Sonuç olarak, katı-sıvı ara yüzünde bir antijen-antikor etkileşimi meydana gelmektedir [11].

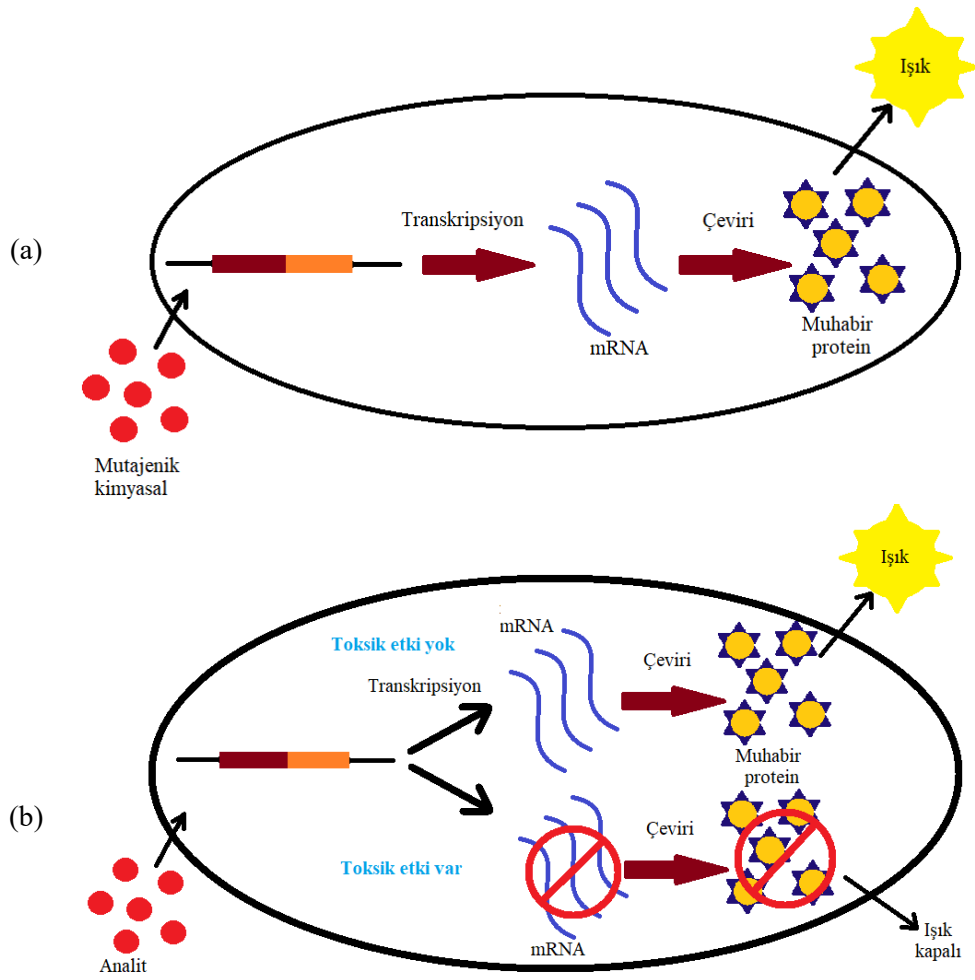
Bu tip sensörlerde antikorların hedef analit moleküllerle etkileşimi tespit edilmektedir. Antikor, antijen, hormon, ilaç, virüs, bakteri ve pestisitlerin tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.2.4. DNA Biyosensörleri

DNA-Aptamer bazlı biyosensörler, yüksek kararlılıkları, özgüllükleri ve çok düşük maliyetleri nedeniyle antikora alternatif olarak geliştirilmiştir [12]. DNA tespiti için kullanılan biyosensörler biyodedektör olarak adlandırılmaktadır. Burada temel amaç, DNA-DNA veya antikor-antijen bağının izole edilerek kuvvetinin ölçülmesidir. Bu yöntem ile DNA veya antijenin tespiti ve karakterinin analiz edilmesi sağlanmaktadır. Biyodedektörün çalışma prensibini şu şekilde açıklayabiliriz. Elde bulunan DNA' nın PCR kullanılarak birden fazla kopyası oluşturulur ve bu kopyalar üzerinde çeşitli biyosensörler kullanılarak birçok ölçüm yapılır. Bu ölçümlerde çeşitli patojenlerin tespitinde çok önemli bir yer almaktadır. DNA biyosensörleri yaygın olarak genetik testler, patojen tespiti, çevre analizi, gıda güvenliği gibi alanlarda kullanılmaktadır.

2.2.5. Tam Hücre Biyosensörleri

Lüminesans raportör genlerine dayanan mikrobiyal biyosensörler, birçok tıbbi uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Genetik olarak tasarlanmış tam hücreli mikrobiyal biyosensör, kimyasal bileşimi, toksisiteyi, kanserojenliği ve mutajenliği gerçek zamanlı ve uygun maliyetli bir şekilde bildirmek için prokaryotik veya ökaryotik hücreleri kullanmaktadır [13]. Biyölüminesans tabanlı biyosensörler genellikle donör deniz mikroorganizması *Vibrio fischeri*'den luxCDABE operonunu ve V. Harveyi 'den lusiferazı kodlayan luxAB genlerini içermektedir [14, 15]. Biyölüminesans tabanlı biyosensörler deki ışık emisyonu, luxCDABE tarafından kodlanan bir dizi reaksiyon tarafından üretilmektedir. Biyölüminesans dayalı biyosensörler üç ana tiptedir: spesifik olmayan toksisite biyosensörleri (kurucu), stres kaynaklı veya yarı spesifik biyosensörler ve analite özgü biyosensörlerdir. Tam hücre mikrobiyal sensörünün genel yapısı ve mutajenik kimyasalların tespiti Şekil 2(a)'da gösterilirken spesifik olmayan bütünün farklı ışık durumlarına göre tespiti Şekil 2(b)'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Tüm hücreli mikrobiyal biyosensörlerin genel prensibi ve yapısı
 (a) mutajenik kimyasalların/ilaçların saptanması için analite özgü biyosensörün yapımı ve genetik mühendisliği (b) spesifik olmayan bütünü " Açık ışık " ve "Kapalı ışık " durumu için örnekleri

3. Karakterizasyon Yöntemleri

Biyosensörler, biyolojik etkileşimleri algılamada ve ölçmede kullanılan cihazlar olarak önemli rol oynamaktadırlar. Bu cihazlar proteinler, DNA, hücreler gibi biyolojik moleküllerin varlığını ve aktivitesini tespit etmek ve bu tespit edilen biyolojik varlıklar hakkında bilgi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Biyosensörlerin performansını değerlendirmek ve ölçümü gerçekleştirilen biyolojik olayların tutarlı bir biçimde yorumlanması amacıyla karakterizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan karakterizasyon yöntemleri arasında elektriksel, kimyasal, kronoempedans, interferometrik, amperometrik yöntemler bulunmaktadır. Bu karakterizasyon yöntemleri ile biyosensörlerin duyarlılık, kararlılık gibi performans metriklerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Aşağıdaki bölümlerde en sık kullanılan ve ilerideki bölümlerde deneylerde incelenecek yöntemler hakkında bilgi verilmiştir. Tablo 2' de karakterizasyon yöntemlerine genel bir bakış sağlanmıştır.

Tablo 2. Karakterizasyon Yöntemleri

Karakterizasyon yöntemleri	Ölçülen parametre	Uygulanan method
Elektrokimyasal Empedans	Empedans-Frekans	Alternatif akım (AC)
Spektroskopisi (EIS)		
Kronoempedans	Empedans	Alternatif akım (AC)
Kronokulometrik	Yük miktarı -Zaman	Doğru akım (DC)
Kronoamperometri	Potansiyel-Zaman	Doğru akım (DC)
Optik	Optik özellikler	Elektromanyetik dalgalar
İnterferometrik	Işığın dalga özelliği	Elektromanyetik dalgalar

3.1. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) Yöntemi

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), sistemin elektrokimyasal davranışını incelemek amacıyla kullanılan bir karakterizasyon yöntemidir. Bu yöntem, alternatif akımın (AC) belirli bir frekans aralığında uygulanması ve bu esnada sistemdeki empedansın frekansa bağlı olarak ölçülmesiyle gerçekleştirilmektedir. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile yüzey hassasiyetlerini ve elektriksel dirençlerdeki farklılık tespit etmek mümkün olmaktadır [16].

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile yapılan geniş bir frekans aralığındaki ölçümler ile yüksek hassasiyet elde edilmektedir. Bu teknik ile elektrokimyasal sistemlerin karakterizasyonu ve biyosensörlerin geliştirilmesi sağlanabilmektedir.

Bu yöntem, yük transfer direncinin (R_{ct}) glikoz konsantrasyonunun fonksiyonu olarak değerlendirilmesine dayanmaktadır. Yöntemin avantajı, düşük ölçüm hatasıdır fakat tek bir değerini hesaplamak için çoklu empedans ölçümü gerektirmektedir. [17].

3.2. Kronoempedans Yöntemi

Kronoempedans yönteminde bir biyosensör yardımıyla gerçek zamanlı ölçümler yapılmaktadır. Bu yöntem ile ölçüm yapılacak çözelti / bileşik ile etkileşimde bulunan elektrot üzerinden bir gerilim uygulanmaktadır. Bu işlemin ardından elektrot üzerinde meydana gelen empedans değişimi değerlendirilmektedir.

3.3. Kronokulometrik Yöntemler

Kronokulometri (CC) tekniğinde, elektrot yüzeyindeki yük miktarı ile zaman ilişkisi incelenmektedir. Kulometre, analiti kantitatif olarak başka bir oksidasyon durumuna geçirmek için gerekli elektriği (kulon olarak) ölçen bir grup analitik yöntemdir. Akımın zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle ve bu grafiğin elektronik olarak veya matematiksel metotla integralinin alınmasıyla toplam yük bulunmaktadır. Bu yöntemle yük ve zaman arasındaki ilişki gözlemlenmesi sağlanır.

3.4. Kronoamperometri Yöntemi

Kronoamperometri yönteminde çalışma elektrodunun potansiyeli ani bir şekilde değiştirmektedir. Anotta bir yükseltgenme ve katotta bir indirgenme reaksiyonu gerçekleştiğinde faradaik reaksiyon gerçekleşir. Bu reaksiyon henüz meydana gelmediği yani yüzeyde elektroaktif türlerin konsantrasyonunun neredeyse sıfır olduğu bir potansiyelden, elektron aktarım hızının çok yüksek olduğu bir potansiyele aniden değiştirilmesi ile durgun ortamda potansiyel-zaman ilişkisi inceleme yöntemidir.

3.5. Optik Yöntemler

Optik karakterizasyon ile biyosenörlerin optik sinyalleri kullanarak biyolojik etkileşimleri tespit ettiği yöntem olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde biyosensörler optik özellikleri değişen hedef molekül ile etkileşime girmektedir. Kullanılan optik sinyaller ışık emilimi yansıması, saçılması, kırılması biçiminde olabilmektedir. Optik sinyallerde meydana gelen değişiklikler ölçülerek hedef molekül hakkında bilgi elde edilmektedir. Bu yöntem günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır.

3.6. İnterferometrik Yöntemler

İnterferometrik karakterizasyon yöntemi ile interferometri prensipleri kullanılarak biyolojik olayların tespit edilmesi amaçlanmaktadır. İnterferometri, ışık dalgasının birden fazla dalga boyuna ayrılması yaklaşımına dayanmaktadır. Biyosensörlerde, hedeflenen biyolojik moleküllerle etkileşime giren optik dalgaları interferometrik bir yapı oluşturmakta ve bu yapı birleşmektedir. Bu etkileşimin sonucunda meydana gelen optik değişiklikler sonucunda biyolojik hedefin varlığı algılanıp, ölçülebilmektedir. Bu yöntem hassas analizlerde ve biyolojik varlıkların algılanması gibi karakterizasyon uygulamalarında kullanılmaktadır.

4. Biyosensörler ile Örnek Uygulamalar

Biyosensörler ile çeşitli biyolojik-kimyasal sistemlerden elde edilen verileri algılamak, analiz etmek ve karakterize etmek mümkündür. Bu nedenle biyosensör teknolojisi çeşitli uygulama alanlarında büyük bir potansiyel taşımaktadır. Aşağıda biyosensörler kullanılarak gerçekleştirilen örnek uygulamalar genel bir bakış gerçekleştirilmiş ve bu uygulamalarda karakterizasyon yöntemlerinin kullanımı incelenmiştir. Biyosensör teknolojisinin gelecekteki önemli yeri vurgulanmak istenmiştir.

4.1. Karbon Macunu/Glikoz Oksidaz (CP/GOx) Bazlı Glikoz Biyosensörü İçin Transdüksiyon Yöntemi Olarak Krono Empedans Tekniğinin Değerlendirilmesi

Martinez, C. ve arkadaşları çalışmalarında karakterizasyon temelinde gerçekleştirilen bir araştırmayı ele almaktadır. Bu çalışmada biyosensör sınıflandırmasında sinyal iletimi başlığı altında değerlendirilen elektrokimyasal biyosensörler, elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemi, kronoamperometri yöntemi ve kronoempedans yöntemi kullanılmıştır. Glikoz konsantrasyonunun gerçek zamanlı ölçümü için krono empedans tekniği (CIT) önerip uygulamışlardır. Bunun için birinci nesil glikoz biyosensörlerde CP/GOx bazlı biyosensörler kullanılmıştır. Bu malzeme, yüksek bir kimyasal inertlik sahiptir ve düşük elektrik direnci ile çok çeşitli anot çalışma potansiyelleri sağlamıştır. Karbon, enzimi polarize etmek için yeterli bir elektrik ortamı sağlamış ve biyosensör aracılığıyla akımın ölçülmesine izin vermiştir [18].

Deney düzeneği kurulduktan sonra biyosensörün performansını değerlendirmek için Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) kullanmışlardır. Ardından glikoz konsantrasyonlarındaki artışından kaynaklanan elektrot-elektrolit arayüz empedansı (electrode-electrolyte interface impedance EEIZ) belirlenmiş ve farklı konsantrasyonlar için en büyük ayrımı düşük frekans aralığında gözlemlemişlerdir. Sonraki aşamada sisteme eklenen glikozun mol başına empedans değişim oranını gösteren yüzde modülü normalleştirme (PMN) değerini hesaplanmışlardır. Düşük ve yüksek PMN değerlerinde ardışık olarak 5mM glikoz ilave edilerek empedans (Z) ve gerçek zamanlı tayini (Φ) incelenip doğrusal, ikinci dereceden polinom ve hiperbolik eğri uydurulmuştur. Elde edilen en yüksek korelasyon değerlerinin hiperbolik eğri uydurmaya karşılık geldiği gözlemlenmiştir.

Sonraki adımda empedans değişiminin glikozun biyoelektrokatalizinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını doğrulamak için 3 farklı kontrol ölçümleri yapmışlardır. İlk ölçümde biyosensör üzerine art arda glikoz ilave edilmiştir. İkinci yapılan ölçümde biyosensör üzerine tampon çözeltisi art arda ilave edilmiştir. Son ölçümde ise yalnızca GOx'suz CP 'den oluşan bir sensör, ilkiyle aynı koşullar altında glikoz ile test edilmiştir. Bu aşamalardan elde edilen GOx'suz CP elektrotunun farklı H_2O_2 konsantrasyonlarına empedansimetrik tepkisi araştırmış ve sonuçlar incelenmiştir. Sonuç olarak Yüksek glikoz konsantrasyonu aralığı (5–40 mM) için hiperbolik uydurma düşük aralık (2–10 mM) için doğrusal uydurma ile kalibrasyon tahmin edilmiştir. Glikoz konsantrasyonunun hem yüksek hem de düşük aralıkları için %5'in altında bir bağıl standart sapma (RSD) ile ölçümlerin tekrarlanabilirliğini ve yeniden üretilebilirliğini ortaya koyulmuştur.

Bu deneyde alternatif bir voltaj ekleyerek ara yüz empedansını ölçmek ve R_{ct} 'yi değerlendirmek mümkündür. Ek olarak, Sinyal-gürültü oranı (SNR) iyileştirilir ve ölçüm, elektromanyetik girişime karşı daha az duyarlıdır. İkinci olarak, tek frekanslı bir sinyalin kullanılması çevrimiçi sürekli ölçümlere izin verir. Bu yöntem AC, DC değerlerinin ve frekansın önceden belirlendiği varsayılarak diğer herhangi bir biyosensör sistemine uygulanabilir.

4.2. Protein Karakterizasyonu İçin Yeni Bir Optik Biyosensör

Cross ve arkadaşları karakterizasyon odaklı bir çalışmayı ele almışlardır. Bu çalışmada optik biyosensörlerin sinyal iletimi üzerindeki rolü değerlendirilmiştir. Yazarların ana amacı optik biyosensörlerin kullanımıyla protein karakterizasyonu gerçekleştirmektir. Bu amaç doğrultusunda optik ve interferometrik karakterizasyon yöntemleri kullanılmış ve yeni bir optik biyosensör geliştirilerek protein karakterizasyonunda değerlendirilmiştir.

Yazarlar, optik biyosensör tarafından belirlenen yoğunluk ve kalınlık özelliklerine dayanarak adsorbe edilen protein katmanlarının karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Bu karakterizasyonda çift dalga kılavuzu interferometrik teknik kullanılmıştır. Dalga kılavuzunda TE ve TM modlarının dağılımındaki farklılar biyolojik katmanın kalınlık ve kırılma indisinin belirlenmesine yardımcı olmuştur.[19].

Yazarlar gerçekleştirdikleri deneylerde, fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile aminli bir çipe akıtma işlemi gerçekleştirmişlerdir. İlk deneyde, aminli çip üzerinde pH değeri 7.4 olan stabil bir baz çizgisi elde edilene kadar PBS akıtılmıştır. Daha sonra amin yüzeyine Sülfö-NHS-LC-Biyotin uygulanmış ve ardından kararlı bir baz çizgisi elde edilene kadar PBS akışı devam edilmiştir. Sonrasında PBS içinde çözülen Streptavidin çipe akıtılmış ve reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Streptavidin tabakasının kalınlığı ve kırılma indisi ölçümleri yapılmış ve tamponla yıkama sonrasında hafif bir azalış olduğu gözlenmiştir [20].

İkinci deneyde ise PBS ile amin işlevselleştirilmiş bir çip üzerinden geçirilmiş ve ardından PBS içine anti-HSA enjekte edilmiştir. Anti-HSA tabakasının kalınlığı ve yoğunluğu ölçülmüş, %51,6 kaplama oranı elde edilmiştir. Bu sonuçlar, çift polarizasyon tekniğinin diğer optik ve analitik ölçümlerle karşılaştırıldığında daha detaylı analizler sağlayabileceğini göstermektedir. Yeni interferometrik teknik, ince biyolojik film katmanlarının kalınlığı, yoğunluğu ve kırılma indisi gibi özelliklerinin gerçek zamanlı olarak ölçülmesini sağlamaktadır. Bu teknik, geleneksel tekniklerle uyumlu sonuçlar vererek protein yapılarına ilişkin önemli bilgiler sağlamaktadır [21].

Yapılan deneyler, geliştirilen interferometrik tekniğin etkili bir araç olduğunu ve biyomedikal uygulamalarda önemli bir yere sahip olabileceğini göstermektedir. Bu teknik, biyosensörlerin tasarımı ve karakterizasyonunda kullanılabileceği gibi, biyolojik materyallerin özellikleri hakkında bilgi sağlayarak hastalıklarla ilgili fikir vermekte ve araştırmalarda kullanılabilmektedir [22].

4.3. Formaldehit için Elektrokimyasal Bir Biyosensör

Herschkovitz ve arkadaşları çalışmalarında karakterizasyon temelinde gerçekleştirilen bir araştırmayı ele almaktadır. Bu çalışmada biyosensör sınıflandırmasında biyotanıma başlığı altında değerlendirilen enzimatik biyosensörler ve sinyal iletim başlığı altında değerlendirilen elektrokimyasal biyosensörler kullanılmıştır. Yazarlar bu biyosensörlerin kullanımıyla formaldehit tespiti yapmayı hedeflemektedir [23].

Yazarlar çalışmalarında kimyasal olarak formaldehit dehidrogenaz enzimi ve bir Os(bpy)₂-poli(vinilpiridin) (POs-EA) kullanan, bir biyosensör ölçüm cihazı ile bir akış enjeksiyon sisteminin bağlanmasına dayanan yeni bir tespit yönteminin gelişimini bildirmektedir. Hareketsizleştirilmiş FDH ve bir Os(bpy)₂ -poli(vinilpiridin) (POs-EA)

değiştirilmiş SPE kullanan bir biyosensör ölçüm cihazı ile bir akış enjeksiyon sisteminin bağlanmasına dayanan sulu çözeltilerde formaldehit tayini gerçekleştirilmiştir. Burada açıklanan sistem, karşılık gelen dehidrojenazları kullanılarak diğer substratlara kolayca uyarlanabilmektedir. Hava ölçümleri için, standart hava ölçümlerinde olduğu gibi, kirleticinin havadan sulu bir çözeltiye aktarılması ve bir hava örnekleme cihazı ile birleştirilmesi gerekmektedir. Sensör sulu solüsyonda 30 ng ml^{-1} formaldehit algılayabilmektedir. Sensör seçicidir, ucuzdur, birkaç gün boyunca stabildir ve tek kullanımlıktır, ayrıca üretimi ve çalıştırılması kolaydır [24,25].

Elektrokimyasal sistem amperometrik ölçümlere dayanıyordu. SPE, ev yapımı bir mikro akış hücresine yerleştirilerek, bir şırınga pompasına ve bir enjeksiyon döngüsü ile donatılmış bir enjektöre bağlanmıştır. Enzimatik membran doğrudan SPE üzerine yerleştirilmiştir. Elektrotlar, bilgisayar kontrollü bir BAS 100B potansiyostatına bağlanmıştır. Elektrokimyasal hücre, bir şırınga kullanılarak $\text{NAD}^{++} \text{KCl}^+$ potasyum fosfat tampon çözeltisi (pH 8) çalışma solüsyonu ile yıkanmıştır [26].

Elektrokimyasal saptamanın hassasiyeti, NADH'den POs-EA aracı aracılığıyla karbon elektroduna elektron transferinin verimliliğine bağlıdır. Bu nedenle, önce bu reaksiyonun optimal koşullarını belirlenmiştir [26].

Formaldehit varlığında veya yokluğunda, bir Immunodyne® membran üzerinde immobilize edilmiş FDH ile akış hücresinde elde edilen POs-EA modifiye elektrodun döngüsel voltamogramlarını tespit edilmiştir, formaldehit eklenmesi daha yüksek bir anodik akımla sonuçlanmaktadır [26].

Biyosensörün değişen farklı formaldehit konsantrasyonlarının art arda enjeksiyonlarına tepkisi gözlemlenmiştir. Hızlı yanıt ve yüksek hassasiyet açıkça gösterilmiştir. Sinyal akımının azalan kısmında kuyruklar görülmesine rağmen, formaldehite tepki tekrarlanabilir ve doğrusal olarak tespit edilmiştir. FDH'siz kontrol deneylerinde formaldehit enjeksiyonuna yanıt gözlenmemektedir [26].

Kofaktör konsantrasyonunu, pH'ı, akış hızını ve enzim konsantrasyonunu optimize ederek formaldehit sensör performansı optimize edilmiştir. Optimum NAD^+ konsantrasyonu, daha yüksek NAD^+ konsantrasyonlarında mevcut yanıt azalmıştır. NADH'nin reaksiyonu, temas eden tamponun pH'ı ile ters bir şekilde değişmiştir, böylece pH ne kadar yüksekse, reaksiyon hızı o kadar düşüktür. Bu akış hızı, enzimin hem substrat hem de kofaktör ile reaksiyona girmesi için yeterli zaman sağlamıştır [24,25].

NADH'nin aracı tarafından elektrokatalitik oksidasyonunun, NAD^{+-} bağımlı dehidrojenaz enzimleri tarafından katalize edilen reaksiyona bağlanması, çok çeşitli diğer substratlar için amperometrik biyosensörlerin yapımını mümkün kılmaktadır. İmmobilize ADH, fermantasyonla ilgili bir etanol biyosensörü geliştirmek için kullanılabilir. Artan konsantrasyonlarda art arda etanol ilavesi, mevcut yanıtta paralel bir ardışık artışla sonuçlanmaktadır. Konsantrasyon ve yanıt arasında doğrusal bir korelasyon elde edilmiştir. Bu biyosensör, küçük bir enzim yüklemesi kullanarak çok küçük (10^{-9} g) alkol miktarlarını tespit edebilmektedir [27,28].

4.4. Biyosensörler ile Örnek Uygulamaların Değerlendirilmesi

Aşağıdaki tabloda bölüm 4.1. anlatılan uygulamadaki grafiklerin empedansın modülü (Z) ve gerçek zamanlı tayini (Φ) ayrı ayrı analiz edilip her parametre için birkaç tip eğri yerleştirilmiştir.

Tablo 3. Eğri uydurma için korelasyon katsayıları

Eğri tipi	Doğrusal	İkinci dereceden polinom	Hiperbolik
Empedans için korelasyon değeri	0,911	0,992	0,999
Gerçek zamanlı tayini için korelasyon değeri	0,866	0,983	0,998

Yukarıdaki tabloda anlaşılabacağı üzere en yüksek korelasyon değerlerinin hiperbolik eğri uydurmaya karşılık geldiği gözlemlenmiştir. Son olarak krono empedans ve optik yöntem içinde bulunan kolorimetrik yöntemler arasındaki korelasyonu farkı gösterilmiştir. Bu değer $R^2 = 0,98$ gibi yüksek bir korelasyon elde edilmiştir.

Aşağıdaki tablolarda bölüm 4.2.' de anlatılan örnek uygulamanın sonuçları değerlendirilmiştir.

Tablo 4. Sekiz ölçümün sonucunda elde edilen kalınlık ve kırılma indisi sonuçları

Protein Katmanı	Kalınlık	Kırılma İndisi
LC-Biotin	0.569	53.81
Streptavidin	6.101	15.75
Biotinylated Ab	2.169	1.931

Tablo 4' de art arda gerçekleştirilen sekiz deney serisinin sonucunda protein katmanlarında elde edilen kalınlık ve kırılma indisi değerleri görülmektedir. Biotin katmanının kalınlığında belirgin bir değişiklik görülmüş bu duruma antikorların yönelim farklılıklarının sebep olduğu düşünülmüştür. Antikor tabakasının kalınlığının istikrarlı bir şekilde kontrol edilemediği fikrine varılmıştır. Aşağıdaki Tablo 5' te uygulanan çift polarizasyon tekniği mevcut diğer teknikler ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 5. Çift polarizasyon tekniğinin diğer teknikler ile karşılaştırılması

Teknik	Hassasiyet	Gerçek Zamanlı Ölçüm	Laboratuvar Kullanımına Uygunluk
SPR	-	Evet	Evet
X ışını kristalografisi	Yüksek	Hayır	Evet
Nötron yansıması	Çok yüksek	Hayır	Hayır
Çift polarizasyon	Çok Yüksek	Evet	Evet

Laboratuvar koşullarında yüksek hassasiyet ile gerçek zamanlı ölçüm gerçekleştirilmek istendiğinde” Çift Polarizasyon” tekniğinin diğer tekniklere göre daha başarılı olduğu görülmektedir.

5. Sonuç

Biyosensörler, hedef moleküllerin tespit sürecinde kolaylık sağlayan biyolojik ve kimyasal olayların hassas ve hızlı bir şekilde tespit edilmesinde rol alan biyoteknolojik cihazlardır. Bu gelişmiş teknoloji günümüzde tıp, gıda, çevre gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Çeşitli şekillerde sınıflandırılabilen biyosensörler sinyal iletim ve biyotanıma olarak iki başlık altında incelenmiştir. Sinyal iletim başlığı altında elektrokimyasal, optik, kütleyle duyarlı, termal biyosensörler yer alırken biyotanıma başlığı altında enzimatik, protein reseptörü tabanlı, immunosensör, DNA biyosensörleri, Tüm hücre biyosensörleri yer almaktadır.

Ayrıca karakterizasyon yöntemleri olarak yaygın kullanılan elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), kronoempedans, kronokulometrik, kronoamperometri, optik ve interferometrik yöntemler hakkında temel bilgiler verilmiştir.

Yaygın kullanım alanları bulunan biyosensörler Tıp alanında hastalıkların teşhisi, tedavi takibi, ilaç geliştirme gibi amaçlarla yaygın kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra çevre analizlerinde, gıda kalite ve güvenliği analizlerinde, endüstriyel üretim süreçlerinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır.

Biyosensörlerin karakterizasyonu, performanslarının belirlenmesi ve kalite kontrolünün yapılması açısından son derece önem arz etmektedir. Bu amaçla çeşitli deneyler gerçekleştirilmektedir. Yazımızda bu amaçla gerçekleştirilen bazı deneyler incelenmiştir.

İlk yöntemde alternatif bir voltaj ekleyerek ara yüz empedansını ölçmek ve R_{ct} 'yi değerlendirmek için tek frekanslı bir sinyalin kullanılması ve AC-DC voltaj değerlerinin ve frekansın önceden belirlenmiştir. Böylece çıktıdaki SNR iyileştirilir ve ölçü elektromanyetik girişime karşı daha az duyarlı hale getirilmiştir.

Yeni geliştirilen optik biyosensör aracılığıyla (ikinci çalışma) protein katmanlarının yoğunluk, kalınlık gibi karakterizasyonlarının çift dalga kılavuzu interferometrik tekniğine dayalı optik biyosensör yardımıyla anlık ve hızlı bir biçimde ölçülebildiği görülmüştür. Protein katmanlarının belirlenecek kalınlık gibi özelliklerinin belirlenmesi sırasında dalga kılavuzu farklı polarizasyonlarda kullanılmaktadır. TE (Transverse Electric) ve TM (Transverse Magnetic) modlarının dağılımındaki farklılıklar biyolojik katmanın kalınlık ve kırılma indisinin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Elde edilen kırılma indisi gibi verilen DSP üzerinden bir bilgisayara aktararak anlık olarak karakterizasyon verileri sağlamaktadır.

Üçüncü çalışmada ise genel olarak uygulanabilir bir yaklaşım ve enzimatik olarak üretilen NADH 'nin aracılı oksidasyonuna dayanan üç örnek sunulmuştur. Deneylerimizde formaldehit, alkol ve sorbitolün ilgili tespiti için formaldehit dehidrojenaz, ADH ve SDH olmak üzere üç dehidrojenaz kullanılmakta ve formaldehit tespitini vurgulanmaktadır. Sonuç olarak uygun bir biyosensör, temel gereksinimleri bir araya getiriyor: basitlik, seçicilik, hassasiyet, yeniden kullanılabilirlik, geniş bir çalışma aralığı ve düşük maliyet.

Biyosensör teknolojisi sayesinde daha sağlıklı güvenli ve sürdürülebilir bir dünyaya adım atmamız mümkün olacaktır. Bu nedenle biyosensör teknolojisinin geliştirilmesi, yaygınlaştırılması son derece önemlidir.

Kaynakça

- [1] Mohanty, S. P., & Kougianos, E. (2006). Biosensors: A tutorial review. *Ieee Potentials*, 25(2), 35-40.
- [2] Marquette, C. A., & Blum, L. J. (2006). State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8), 1424-1433.
- [3] Su, L., Jia, W., Hou, C., & Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: a review. *Biosensors and bioelectronics*, 26(5), 1788-1799.
- [4] Yoo, S. M., & Lee, S. Y. (2016). Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms. *Trends in biotechnology*, 34(1), 7-25.
- [5] Ziegler, C., & Göpel, W. (1998). Biosensor development. *Current opinion in chemical biology*, 2(5), 585-591.
- [6] Raiteri, R., Grattarola, M., Butt, H. J., & Skládal, P. (2001). Micromechanical cantilever-based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 79(2-3), 115-126.
- [7] Ramanathan, K., and Danielsson, B. (2001). Nanoscale biosensors and biochips. *Biosens. Bioelectron.* 16,417–423.
- [8] Hassan, S. H., Van Ginkel, S. W., Hussein, M. A., Abskharon, R., & Oh, S. E. (2016). Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. *Environment international*, 92, 106-118.
- [9] Marco, M. P., & Barcelo, D. (1996). Environmental applications of analytical biosensors. *Measurement Science and Technology*, 7(11), 1547.
- [10] Paddle, B. M. (1996). Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors and Bioelectronics*, 11(11), 1079-1113.
- [11] Scheller, F. W., Wollenberger, U., Warsinke, A., & Lisdat, F. (2001). Research and development in biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(1), 35-40.
- [12] Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *nature*, 346(6287), 818-822.
- [13] He, W., Yuan, S., Zhong, W. H., Siddikee, M. A., & Dai, C. C. (2016). Application of genetically engineered microbial whole-cell biosensors for combined chemosensing. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 1109-1119.
- [14] Prosser, J. I. (1994). Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment. *Microbiology*, 140(1), 5-17.
- [15] Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2001). The use of whole-cell biosensors to detect and quantify compounds or conditions affecting biological systems. *Microbial ecology*, 42, 483-494.
- [16] GUNDOĞDU, A., GAZOĞLU, G., KAHRAMAN, E., YİLDİZ, E., CANDİR, G., YALCİN, D., ... & Fatih, Ş. E. N. (2023). BIOSENSORS: TYPES, APPLICATIONS, AND FUTURE ADVANTAGES. *Journal of Scientific Reports-A*, (052), 457-481.
- [17] Shervedani, R. K., Mehrjardi, A. H., & Zamiri, N. (2006). A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor. *Bioelectrochemistry*, 69(2), 201-208.
- [18] Zhang, S., Wright, G., & Yang, Y. (2000). Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(5-6), 273-282.
- [19] Cross, G. H., Reeves, A. A., Brand, S., Popplewell, J. F., Peel, L. L., Swann, M. J., & Freeman, N. J. (2003). A new quantitative optical biosensor for protein characterisation. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(4), 383-390.
- [20] Pugliese, L., Coda, A., Malcovati, M., & Bolognesi, M. (1993). Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2·7 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 231(3), 698-710.
- [21] Lukosz, W., Clerc, D., & Nellen, P. M. (1990). Input and output grating couplers as integrated optical biosensors. *Sensors and Actuators A: Physical*, 25(1-3), 181-184.
- [22] Knoller, S., Shpungin, S., & Pick, E. (1991). The membrane-associated component of the amphiphile-activated, cytosol-dependent superoxide-forming NADPH oxidase of macrophages is identical to cytochrome b559. *Journal of Biological Chemistry*, 266(5), 2795-2804.

- [23] National Air Quality and Emissions Trend Report: Air Toxics, US Environmental Protection Agency, 1996, Ch. 5. (https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-11/documents/trends_report_1996.pdf) (Eriřim tarihi: 10.06.2023)
- [24] Vianello, F., Stefani, A., Di Paolo, M. L., Rigo, A., Lui, A., Margesin, B., ... & Soncini, G. (1996). Potentiometric detection of formaldehyde in air by an aldehyde dehydrogenase FET. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 37(1-2), 49-54.
- [25] Hammerle, M., Hall, E. A., Cade, N., & Hodgins, D. (1996). Electrochemical enzyme sensor for formaldehyde operating in the gas phase. *Biosensors and Bioelectronics*, 11(3), 239-246.
- [26] Herschkovitz, Y., Eshkenazi, I., Campbell, C. E., & Rishpon, J. (2000). An electrochemical biosensor for formaldehyde. *Journal of electroanalytical chemistry*, 491(1-2), 182-187.
- [27] L.J. Gorton, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 (1986) 1245. (<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1986/f1/f198682fx015>) (Eriřim tarihi: 10.06.2023)
- [28] Lobo, M. J., Miranda, A. J., & Tunn, P. (1997). Amperometric biosensors based on NAD (P)-dependent dehydrogenase enzymes. *Electroanalysis*, 9(3), 191-202.