

## Biyosensörler: Gıda ve Sağlık Alanında Laktat Biyosensörleri

### Biosensors: Lactate Biosensors in Food and Health Field

Özüm ÖZOĞLU\*

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji  
Enstitüsü, Sistem Biyoteknolojisi İleri  
Araştırma Birimi, 06560, Beşevler,  
Ankara, Türkiye  
E-mail: ozum.ozoglu@gmail.com

Mehmet Altay ÜNAL

Ankara Üniversitesi, Mühendislik  
Fakültesi, Fizik Mühendisliği Bölümü,  
06100, Tandoğan, Ankara, Türkiye  
E-mail: altay.unal@ankara.edu.tr

Evrim Güneş ALTUNTAŞ

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji  
Enstitüsü, Sistem Biyoteknolojisi İleri  
Araştırma Birimi, 06560, Beşevler,  
Ankara, Türkiye  
E-mail: egunes@ankara.edu.tr

Öz

Biyosensörler, hedef analitin varlığı ya da konsantrasyonunu biyoreseptörün spesifikliğı ve konsantrasyonu ile orantılı olarak elde edilen sinyal aracılığıyla belirleyen cihazlardır. Hızlı, hassas, güvenilir, kolay taşınabilir ve ekonomik cihazlar olmaları nedeniyle geleneksel analitik metodlara güçlü bir alternatifirler.

Anaerobik metabolizma yolunun önemli bir metaboliti olan laktatın (laktik asit) varlığı, organizmaların sağlığı ve bazı gıda süreçleri gibi birçok reaksiyon için önemli bir göstergedir. Laktik asit bakterileri tarafından doğal olarak üretilen laktat, fermente gıda ürünleriyle birlikte diğer pek çok yiyecek ve içecekte bulunmaktadır. Bu nedenle; gıda endüstrisinde laktat seviyesi, ürünlerin; tazelik, stabilite ve kalite özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Diğer bir açıdan, anaerobik koşullar altında laktat üretimi; insanlarda yorulmanın ve hidrasyonun bir işaretidir. Kan laktat düzeylerinin hızlı olarak belirlenmesi, septik şok hastalarında çoklu organ yetmezliği ve ölümün izlenmesi açısından iyi bir belirteçtir.

Günümüzde, elektrokimyasal biyosensörler; düşük maliyeti, kullanım kolaylığı, mükemmel hassasiyeti ve yüksek seçiciliğı gibi özellikleri nedeniyle laktat seviyelerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Literatürde, laktat biyosensörlerinin çoğu enzimatik amperometrik biyosensörlerdir. Yaklaşık olarak bulunan on beş ticari biyosensörün yanı sıra, laboratuvar koşullarında incelenen çok sayıda biyosensör bulunmaktadır. Çalışmalar, laboratuvar ölçekli yeni biyosensörlerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşırken bunları ticari kullanım amacıyla pazara sunmak önemli bir gerekliliktir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyosensör, Biyoreseptör, Elektrokimyasal, Endüstri, Gıda, Laktat, Sağlık, Transduser

### Abstract

Biosensors are devices that determine the concentration of the target analyte by means of a signal obtained in proportion to the specificity and the concentration of the bioreceptor. They are a powerful alternative to traditional analytical methods due to the fact that they are fast, precise, reliable, portable and economical devices.

Lactate (lactic acid), a key metabolite of the anaerobic metabolism pathway, is an important indicator for lots of reactions, including the health of organisms and some food processes. Lactate which is naturally produced by lactic acid bacteria is found in fermented food products and many other foods and beverages. Thus; lactate level in the food industry is used to determine freshness, stability and quality characteristics of the products. In another aspect, lactate production under anaerobic conditions is a sign of fatigue and hydration. Serial determination of blood lactate levels, is a good predictor to follow the multiple system organ failure and death in septic shock patients.

Today, electrochemical-biosensors are used commonly because of their features such as low cost, easy usage, perfect sensitivity and high selectivity to detect lactate levels. In the literature, most of lactate biosensors are enzymatic amperometric biosensors. Besides the approximately fifteen commercial biosensors, there are a great number of biosensors examined in laboratory conditions. While the studies focused on the development of new biosensors in lab-scale, it is a necessity to gain them as commercial usage.

**Keywords:** Biosensor, Bioreceptor, Electrochemical, Industry, Food, Lactate, Health, Transducer

\*Corresponding author  
Handling Editor: E. Sevindik

## 1. Giriş

Günümüzde gıda, kimya, çevre, sağlık ve biyoteknoloji gibi endüstriler hızlı bir büyüme ve gelişme göstermektedir. Bu endüstrilerde en büyük sorun kalite güvencesi ve süreç kontrolleri için yapılan periyodik analizlerin oldukça yorucu, uzun zaman alan ve deneyimli çalışan gerektiren geleneksel tekniklerle gerçekleştirilmesidir. Bu geleneksel tekniklere örnek olarak gıda endüstrisi temel alındığında kromatografi, spektrofotometri, elektroforez, titrasyon verilebilir. Bunun sonucunda kompozisyonundaki çok sayıda bulunan bileşen konsantrasyonlarını belirlemek uzun zaman almaktadır. Bu nedenle bu endüstrilerde hızlı, hassas, güvenilir, küçük, kolay taşınabilir ve düşük maliyetli tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada biyosensör teknolojisi; küçük ve düşük maliyetli cihazlarla biyolojik sistemlerin hassas ve özgül olarak çalışmasını sağlayarak geleneksel analitik yöntemlere güçlü bir alternatif olmaktadır (Scheller ve Schubert 1992; Canh 1993; Mello ve Kubota 2002; Moser vd. 2002; Velasco-Garcia ve Mottram 2003; Aykut ve Temiz 2006; Viswanathan ve Radecki 2008; Thakur ve Ragavan 2013).

Biyosensörlerin düşük maliyetli cihazlar olmaları oldukça önem arz etmektedir. Tran Minh Canh'ın 1993 yılında yayımlanan biyosensör isimli kitabına göre; Japonya, biyosensör araştırma ve geliştirme (Ar-Ge) alanında o dönemde Dünya'ya hakimdir ve biyosensör ürünlerindeki Japon pazarının yaklaşık olarak 1,5 milyon yen olduğu belirtilmektedir. Japonya'yı takiben Almanya ve diğer Avrupa ülkelerinin (İngiltere, Fransa, İtalya ve İspanya) de biyosensör alanındaki araştırmalara aktif olarak katıldıkları ifade edilmektedir. Ayrıca biyosensörlerin güvenilirliğinin artışının ve maliyetindeki azalmanın aynı yönde ilerlediği ifade edilmektedir. Bunun sonucunda biyosensörlerin ilgili sektörlere daha fazla nüfuz etmesini ve yeni uygulamalara ilgi duyulmasını sağladığı belirtilmiştir (Canh 1993). Küresel Endüstri Analizleri'nin (Global Industry Analysts) 2014 Kasım ayında yayınladığı rapora göre, yeni teknolojilerin ortaya çıkması, şeker hastalığı gibi sağlık konularını yönetme ihtiyacının artması ve yeni uygulama alanlarından gelen güçlü talep nedeniyle 2020 yılında biyosensörlerin global pazarının 20,7 milyar ABD dolarına ulaşması beklenmektedir (Market Research Report Collections 2014).

Biyosensörler; basit olarak, biyolojik bir materyal, tanımlayıcı moleküller olarak biyolojik tanımlayıcı tabaka (biyoreseptör), transduser (dönüştürücü) ve sinyal işleyici kısımlarından oluşan analitik cihazlardır (Tohill 2001). Biyosensörler, kavramsal olarak yeni bir gerçek-zaman yaklaşımını, yerinde ve aynı zamanda birden fazla biyolojik zararlı ajanın tespitini temsil etmektedir (Viswanathan ve Radecki 2008).

Biyosensör terimini ilk defa kullanan Clark ve Lyons (1962), glukoz sensörü olarak kullanılmak üzere enzim-elektrot kompleksini üretmişlerdir (Clark ve Lyons 1962). Bu tarihten sonra biyosensör alanında olağanüstü gelişmeler söz konusu olmuştur (Luong vd. 1997; Thévenot vd. 2001; Kulkarni vd. 2014; Bahadır ve Sezgintürk 2015).

Biyosensör araştırma ve geliştirmelerinin daha çok sağlık, çevre uygulamaları ve gıda endüstrisine doğru yönelim

gösterdiği görülmektedir (Velasco-Garcia ve Mottram 2003). Özellikle patojen belirleyici biyosensörlerin; sağlık, askeri, gıda ve çevreyle ilgili endüstri alanlarında giderek artması beklenmekte olup uygun pazar payı da bulunmaktadır (Canh 1993; Alocilja ve Radke 2003).

### 1.1 Biyosensörler

#### 1.1.1 Biyosensör Tanımı ve Tarihçesi

Biyosensör, örnek içinde bulunan analitin konsantrasyonunu ya da aktivitesini belirlemek için transduserle biyoreseptörün birleşimini içeren cihazı ifade etmektedir (Rustagi ve Kumar 2013). Biyosensörlerde hedef analitin konsantrasyonu, transduserden biyoreseptörün spesifikliği ve konsantrasyonu ile orantılı olarak elde edilen sinyal aracılığıyla belirlenir. Bu sinyal; proton konsantrasyonundaki değişiklikler, amonyak ya da oksijen gibi gazların salınması ya da yükseltgenmesi, ışık emisyonu, absorpsiyon ya da reflektans, ısı emisyonu, kütle değişikliğinin sonucu olarak oluşmaktadır. Sinyal, dönüştürücü tarafından akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışık absorpsiyonu gibi ölçülebilir cevaplara ya da elektrokimyasal, termal, optik ya da piezoelektrik kütle artışına dönüştürülebilmektedir. Sinyal, gelecekteki çalışmalar için güçlendirilebilmekte, işlenebilmekte, depolanabilmektedir. Prensip olarak herhangi bir reseptör, uygun olan herhangi bir transduserle operasyonel bir biyosensör üretmek için birleştirilebilir (Junhui vd. 1997; Aykut ve Temiz 2006). Biyosensörler, şematik gösterimi Şekil1'de gösterilmektedir (Velasco-Garcia ve Mottram 2003).

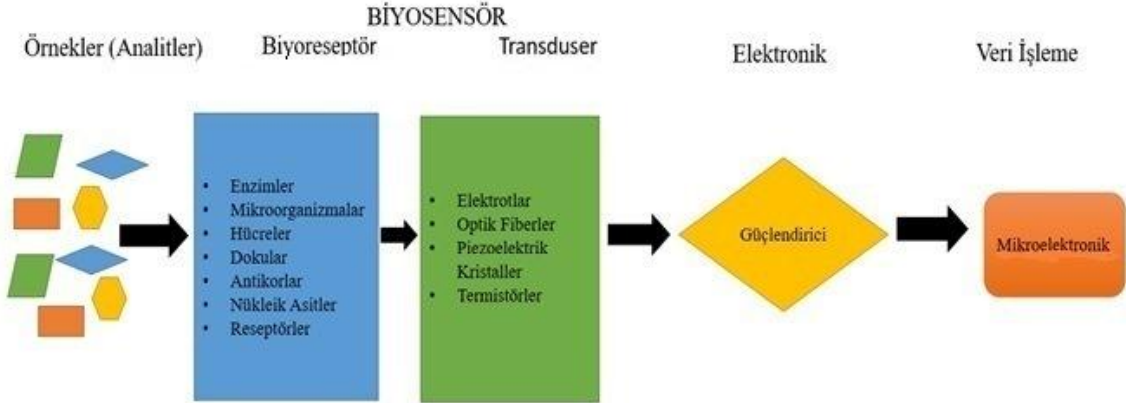
Biyosensörler temelde biyoreseptör ve transduser olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Biyoreseptör; analitin tanınmasından ve büyük ölçekte sensörün spesifikliği ve hassasiyetinden sorumlu kısmı oluşturmaktadır. Biyoreseptörler, belirli bir substrata bağlanabilecek özellikte olup enzim temelli, tüm hücre temelli ve biyoaffinite temelli olmak üzere 3 grup altında toplanmaktadır (Mehrvar vd. 2000; Aykut ve Temiz 2006; Thakur ve Ragavan 2013).

Biyosensörlerin transduser kısmı; sinyalin, tanımlayıcı sistemin (biyoreseptörlerin) çıkış alanından genellikle elektriksel alana iletilmesini sağlamaktadır (Thévenot vd. 2001).

Biyosensörlerin başarılı bir şekilde çalışabilmeleri için bazı önemli özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Chaplin ve Bucke 1990; Leonard vd. 2003; Thakur ve Ragavan 2013):

- i. Seçicilik: Biyosensör cihazı, hedef analit için yüksek seçiciliğe sahip olmalı ve benzer kimyasal yapılara sahip kısımlara hiçbir şekilde çapraz reaktivite göstermemeli ya da minimum düzeyde göstermelidir. Biyokatalistler de hedef analiz için yüksek spesifikliğe sahip olmalı, kolorimetrik enzim şeritleri ve daldırmalı seviye ölçme çubukları hariç normal depolama koşulları altında stabil olmalı ve fazla sayıdaki analizlerde de iyi bir stabilite göstermelidir (Chaplin ve Bucke 1990; Leonard vd. 2003; Thakur ve Ragavan 2013).

- ii. Hassasiyet: Reaksiyonun, karıştırma, pH ve sıcaklık gibi kontrol edilebilir fiziksel parametrelerden bağımsız olması gerekmektedir. Biyosensör cihazıyla ölçüm yapılırken örneklerin ön temizliği gibi ön muamele işlemlerinin olabildiğince az düzeyde tutulması gerekmekte dolayısıyla fazla basamak olmaması istenmektedir. Eğer reaksiyon koenzim ya da kofaktörler içeriyorsa, bunların tercihen enzimle birlikte ko-immobilize halde bulunması gerekmektedir (Chaplin ve Bucke 1990; Leonard vd. 2003; Thakur ve Ragavan 2013).
- iii. Yanıtların Doğruluğu: Yanıtların; kesin, hassas, seyreltme ve konsantrasyon olmadan yararlı analitik aralığın üzerinde tekrarlanabilir ve doğrusal olması gerekmektedir. Ayrıca elektriksel gürültüden arındırılmış olması gerekmektedir (Chaplin ve Bucke 1990; Leonard vd. 2003; Thakur ve Ragavan 2013).
- iv. Sinyal Yanıtlarının Tekrarlanabilirliği: Aynı konsantrasyonlara sahip örneklerin, birden fazla kez analiz edildiklerinde her seferinde aynı sonucu vermeleri gerekmektedir (Thakur ve Ragavan 2013).
- v. Hızlı Tepki Süresi ve İyileşme Süresi: Biyosensörün etkin bir şekilde çalışabilmesi için hedef analitin gerçek zamanlı izlemesinde yeterince hızlı sürede cevap vermesi gereklidir. Biyosensörün yeniden kullanılabilirliği için iyileşme süresinin kısa olması gerekmektedir (Thakur ve Ragavan 2013).
- vi. İşlevsellik: Eğer biyosensör, klinik durumların invaziv izlemesi için kullanılacaksa probunun herhangi bir toksik ya da antijenik etkiye sahip olmaması, ufak ve biyouyumlu olması gerekmektedir. Eğer biyosensör, fermentörlerde kullanılacaksa steril edilebilir olması gerekmektedir. Biyosensörler, tercihen otoklavlanabilirler. Ancak hiçbir biyosensör enzimi bu derece şiddetli ıslak-ısı muamelesine dayanamayabilir. Her iki durumda da biyosensörlerin kirlenme ya da proteoliz eğilimi olmaması gerekmektedir (Chaplin ve Bucke 1990; Leonard vd. 2003).
- vii. Kararlılık (Stabilite) ve Çalışma Ömrü: Farklı biyokimyasal ve çevresel şartlarda biyolojik komponentlerin çoğu kararlı özellik göstermemektedirler. Bu nedenle biyolojik elementlerin aktivitelerinin uzun süre muhafaza edilebilmeleri için arayüz edilerek kullanılması gerekmektedir. Bu sayede biyosensörler pazarlanabilir ve pratikte alanında faydalı olarak kullanılabilir hale gelmektedir (Chaplin ve Bucke 1990; Leonard vd. 2003; Thakur ve Ragavan 2013).
- viii. Kullanıcı Dostu Olma: Biyosensörlerin; ucuz, küçük, taşınabilir ve yarı kalifiye operatörler tarafından kullanılacak düzeyde olması gerekmektedir (Chaplin ve Bucke 1990; Leonard vd. 2003).



Şekil 1. Biyosensörün şematik gösterimi (Velasco-Garcia ve Mottram 2003)

Leland Charles Clark Jr. (Antioch College, Yellow Springs ve Cincinnati Çocuk Hastanesi, Ohio, ABD) biyosensör çalışmalarının öncüsü olarak bilinmektedir (Renneberg ve Lisdat 2006; Thakur ve Ragavan 2013). Clark, kalp ve akciğer makinelerindeki ven ve arter kan döngüsünün oksijen gerilimini düzenli izlemenin gerekliliğini belirtmektedir. Uzun yıllar boyunca kalp ve akciğer makinelerinde kan oksijen gerilimi için polarografik yöntemler kullanılmıştır. Ancak bu yöntem, uzun süreler boyunca çalışacak ve sürekli mutlak oksijen gerilimi kaydını tutacak bir cihazı gerekli kılmaktadır. Bu nedenle Clark ve arkadaşları çıplak bir platin katodu ve üzeri selo-

fan kaplanmış katodun ikisiyle birlikte dış referans anotları kullanarak eski katodlardan daha iyi bir şekilde ilerleme kaydettikleri kandaki kısmi gazların gerilimini ( $pO_2$  ve  $pCO_2$ ) ve kanın pH değerini ölçen bir elektrot geliştirmişlerdir (Oksijen Elektrodu) (Clark 1956). Bu gelişmenin ardından Clark ve Lyons, hidrofobik membran ve dializ membran, glukoz oksidaz enzimi (GOD) ve  $pO_2$  elektrot kullanarak kandaki glukoz içeriğini hassas bir şekilde ölçebilen bir enzim elektrot sistemi geliştirmişlerdir (Clark ve Lyons 1962). Updike ve Hicks 1967 yılında Clark ve Lyon'un enzim elektrot sistemini temel alarak; ürün formasyonunu ya da

ayraç tüketimini izleyerek analit konsantrasyonunu ölçen ilk amperometrik biyosensörü geliştirmişlerdir (Mello ve Kubota 2002; Thakur ve Ragavan 2013).

1969 yılında Guilbault ve Montalvo, amonyum iyonlarına cevap verebilen bir Beckman katyonik cam elektrodunun üzerine ince bir film immobilize üreaz yerleştirerek yaptıkları için üre elektrodu adını verdikleri substrat üre miktarını belirleyen üre dönüştürücü geliştirerek ilk potansiyometrik enzim elektrodunu tanımlamışlardır (Guilbault ve Montalvo 1970).

Mindt ve Racine (Hoffmann la Roche) 1973 yılında ilk laktat sensörünü geliştirmeyi düşünmüşlerdir. Yine 1973 yılında Guilbault ve Lubrano, platinyum elektrotta hidrojen peroksidin belirlenmesine dayanarak glukoz ve laktat enzim sensörünü tanımlamışlardır (Palleschi vd. 1990; Scheper vd. 2006; Thakur ve Ragavan 2013).

1974 yılında Klaus Mosbach ve Bengt Daniellsson, ısı sensörünü matris bağlayıcı enzim preparasyonunun yanına yerleştirerek ve sıcaklık ölçüm birimiyle bağlantılı olan, enzim aktivitelerinin çevresinde meydana gelen sıcaklık değişimlerini direk ölçen ısı hassasiyetli enzim sensörünü yani termistörü geliştirmişlerdir (Mosbach ve Daniellsson 1974).

Enzim elektrot sisteminin geliştirilmesinden bir süre sonra Yellow Springs Instruments (YSI), Clark ve Lyon'un enzim elektrot sistemini geliştirerek amperometrik olarak hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) belirleyen glukoz analiz edici cihazı (YSI23006) 1975'te piyasaya sürmüşlerdir. Aslında firma ilk olarak 1973 senesinde biyosensör cihazını piyasaya sürse de parazit sorunu nedeniyle geri çekilmek zorunda kalmıştır. Ve bu sorunun ilave bir membran eklenerek yani sandeviç membran yöntemini geliştirerek (enzim, nükleopor polikarbonat membran ve selüloz asetat membran arasında tutularak) çözülmesiyle 1975 yılında ilk biyosensör cihazının piyasaya sürülmesi gerçekleştirilmiştir (Scheper vd. 2006; Thakur ve Ragavan 2013).

1975 yılında biyosensörler, Divies'in ethanol analizi için oksijen prob ve *Acetobacter xylinum*'un selülozik pelikülünün kombinasyonuyla mikrobiyal elektrodu tasarlamasıyla yeni bir evrim geçirmişlerdir (Divies 1975). Clemens ve arkadaşları 1976 yılında bir elektrokimyasal glukoz biyosensörü, yapay bir pankreas yatağında birleştirmişlerdir. Ardından bu sensör, Biyostatör olarak Miles Laboratuvarları tarafından pazarlanmıştır (Scheper vd. 2006; Thakur ve Ragavan 2013).

1976 yılında La Roche (İsviçre) tarafından polarize platin elektrot üzerine küçük bir reaksiyon odasında sitokrom b2 yerleştirilmiş ilk enzim elektrot temelli laktat biyosensörü (Lactate Analyzer LA 640) geliştirilmiştir (Scheller ve Schubert 1992; Malhotra ve Chaubey 2003; Thakur ve Ragavan 2013).

1983 yılında Liedberg ve arkadaşları, Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance-SPR) tekniğini geliştirerek kimyasal sensörler alanına yeni bir optik teknik kazandırmışlardır (Liedberg vd. 1983).

1984 yılında Turner ve arkadaşları, düşük maliyetli enzim elektrotların üretimi için immobilize aracı (mediatör) olarak ferrosen ve türevlerinin oksidoredüktazlarla kullanımı hakkında bir bildiri yayınlamışlardır. Bu hali, MediSense tarafından 1987'de Amerika Cambridge'de piyasaya sürülen kalem ölçer sayacıyla birlikte evde

kandaki glukozun izlenmesini sağlayan ekran baskılı enzim elektrodun temelini oluşturmuştur (Thakur ve Ragavan 2013).

## 1.2 Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, çalışma prensipleri dikkate alınarak biyoreseptörü ve fiziksel transduserlerine göre iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Biyosensörlerin bu iki ana sınıfa göre detaylı şekilde sınıflandırılması Şekil 2'de gösterilmektedir (Thakur ve Ragavan 2013).

### 1.2.1 Biyolojik Tanımlayıcı Elementine Göre Biyosensörler

#### 1.2.1.1 Enzim Temelli Biyosensörler

Biyosensörler arasında biyoreseptörü enzim olanlar üzerinde daha fazla çalışma yapılmıştır. Enzimler; yüksek seçicilikleri ve substrata yönelik aktiviteleri nedeniyle biyolojik aktif materyal olarak kullanılabilir en iyi materyallerdir. Başlangıçtaki reaksiyon hızları nedeniyle enzimler, çoğunlukla substratların konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda pek çok biyokimyasal reaksiyon spesifik enzimler tarafından katalizlenmektedir. Bu nedenle enzimler, biyosensörlerde katalitik bileşen olarak geniş anlamda kullanılmaktadırlar. Enzimler, biyosensörlerde yalnız bir şekilde katalitik eleman olarak kullanılabilirdiği gibi alternatif olarak antikor gibi diğer bileşenlerle birleşerek belirteçlerde sinyal yükseltici olarak da kullanılabilirler. Enzim temelli biyosensörlerin çoğunda enzim olarak oksidoredüktazlar kullanılmakta ve bu oksidoredüktazların da yaygın olarak iki alt sınıfı olan oksidaz ve dehidrojenazlar kullanılmaktadır (Chaplin ve Bucke 1990; Wilson ve Hu 2000; Tohill 2001; Choi 2004; Rustagi ve Kumar 2013; Rathee vd. 2016).

Bir enzim temelli biyosensörün konsepti; sensör yüzeyinin yakınına enzim yerleştirilmesine dayanmaktadır. Enzimatik temelli biyosensörlerde biyosensör, substratın konsantrasyonunu sensör yüzeyindeki enzimatik reaksiyonlara göre belirlemektedir. Reaksiyon iki benzer prosesle kontrol edilmektedir. Bunlar; substrattaki enzimatik dönüşüm ve ürünün enzim katmanından difüzyonudur (Turner vd. 1989; Rathee vd. 2016).

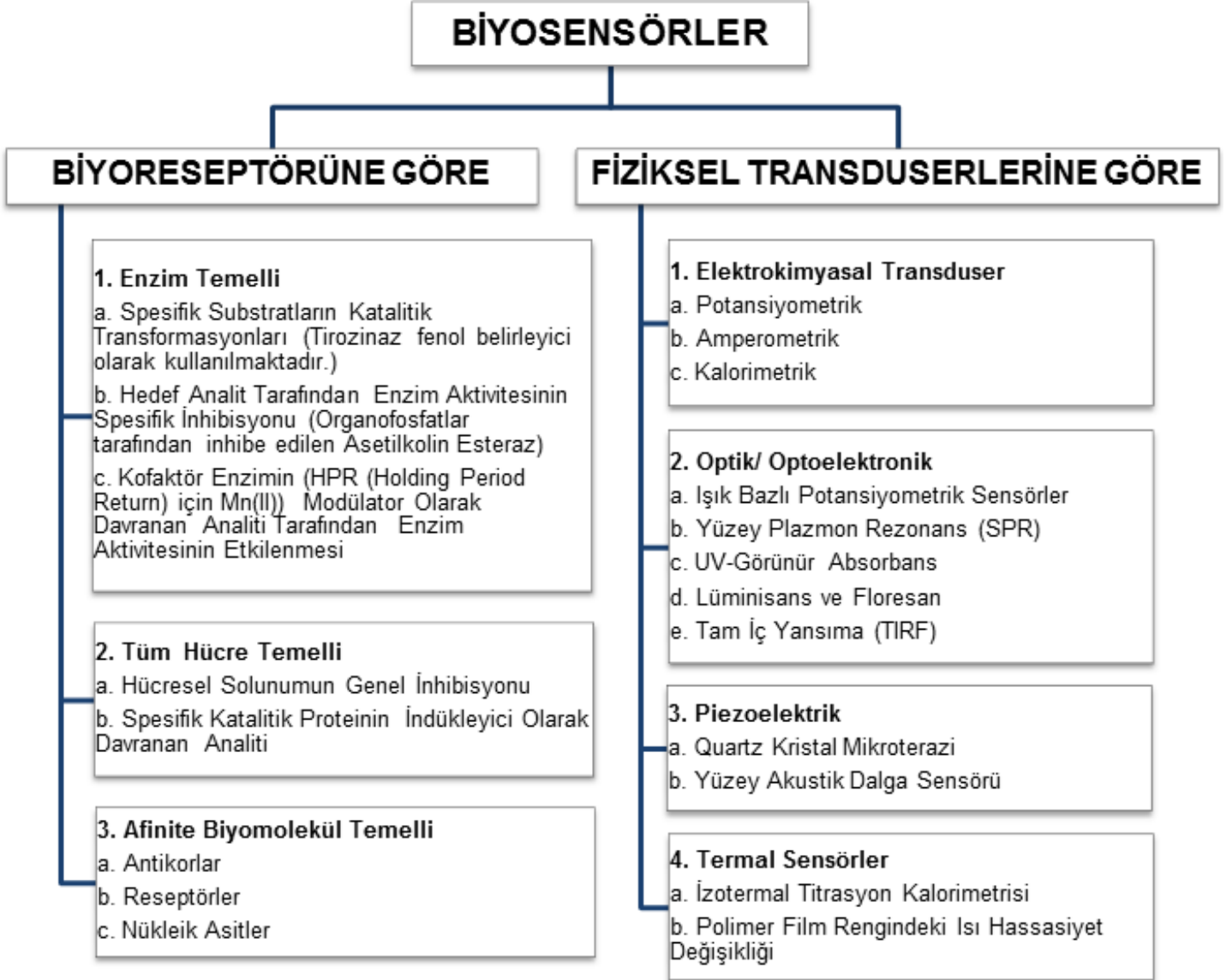
Enzim temelli biyosensörler, enzim elektrodun icadından beri (Clark ve Lyons 1962) çeşitli potansiyel uygulama alanları nedeniyle giderek artan bir şekilde dikkatleri çekmektedir. Enzim temelli biyosensörler; biyotıp, çevre, gıda kalite kontrol, tarım ve ilaç endüstrilerinde çeşitli hedef analitlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde oldukça önemli bir tekniktir. Pratik ve ticari açıdan 4 tip enzim temelli biyosensör yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar; glukoz (diyabetin tanı ve tedavisi, gıda bilimi, biyoteknoloji), laktat (spor hekimliği, yoğun bakım, gıda, biyoteknoloji), üre (klinik uygulamalar) ve glutamat / glutamindir (gıda, biyoteknoloji) (Wilson ve Hu 2000; Zhao ve Jiang 2010; Ispas vd. 2012).

Enzimlerin; pH, sıcaklık, iyonik kuvvet gibi özelliklerinin kararlılık göstermemesinden dolayı biyosensörlerde kullanımı sınırlandırılmaktadır. Bu nedenle enzim temelli biyosensörler tasarlanırken enzimlerin aktivitelerini

sürdüremeleri için uygun ortam sağlanmaya çalışılır. Bu ortam, biyokatalizörün destekle birleştirilmesi ya da biyokatalitik dönüşümün immobilize materyallerle genişletilmesi şeklinde sağlanabilmektedir (Göpel ve Heiduschka 1995; Tothill 2001; Choi 2004; Zhao ve Jiang 2010; Rustagi ve Kumar 2013).

Enzim immobilizasyonu, enzimin substrat ve ürünler için olandan farklı bir faza (matris / destek) bağlanmasıdır. Diğer bir ifadeyle enzim immobilizasyonu; enzimlerin fiziksel olarak sınırlandırılmasını ya da katalitik aktivitelerinin alıkonulmasıyla belirli bir alana yerleştirilmesini ve tekrar ve sürekli olarak

kullanılabilirliğini ifade etmektedir. Immobilizasyon, enzimin üründen kolayca ayrılmasını sağlamaktadır ve bundan dolayı ürünün protein kontaminasyonu enaza indirilmekte veya tamamen önlenmektedir. Aynı zamanda immobilizasyon, enzim ve enzimatik ürünlerin maliyetini azaltmaktadır. Enzim immobilizasyonunda farklı materyaller kullanılmaktadır. Bu materyaller; jel matris, membran formunda polimerik veya inorganik katı, partikül veya mikroküre formundadırlar (Aksoy vd. 1998; Datta vd. 2012; Brena vd. 2013; Uygun vd. 2013; Mohamad vd. 2015).



Şekil 2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması (Thakur ve Ragavan 2013)

İmmobilizasyon metodu; biyolojik materyalin niteliği, kullanılan dönüştürücünün çeşidi, analitin fizikokimyasal özellikleri, biyosensörün çalışması için gerekli koşullar gibi faktörlere bağlıdır ve tüm bu hususların üstesinden gelmek; biyolojik elemanın, immobilize mikro ortamında maksimum aktivite göstermesi için gereklidir (Zhao ve Jiang 2010). Enzim immobilizasyon metotları;

- i. Adsorpsiyon: İmmobilize enzim hazırlamanın en basit ve hızlı yoludur. Enzim adsorpsiyonu, fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Fiziksel adsorpsiyon Van der Waals bağları nedeniyle zayıfken, kimyasal adsorpsiyon kovalent bağları içerdiği için daha sağlamdır (Singh vd. 2008; Zhao ve Jiang 2010; Datta vd. 2012; Mohamad vd. 2015).

- ii. Tutulma ve Kapsül İçine Alma: Hassas bir işlemdir. Enzimlerin destekleyici jeller ya da lifler içinde tutulduğu dönüştürülemez bir metottur. Bu yöntem reaksiyon gecikmesine neden olacak şekilde substratın difüzyonuna engel oluşturabilmektedir. Bunun yanında jel içindeki gözenekler yoluyla biyoaktivite kaybı da meydana gelebilmektedir (Singh vd. 2008; Zhao ve Jiang 2010; Mohamad vd. 2015).
- iii. Kovalent Bağlanma: Kovalent bağlanma, geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonu için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu metotta bağlar, biyomateryaldeki fonksiyonel grupla destekleyici matris arasında oluşur (Singh vd. 2008; Zhao ve Jiang 2010; Datta vd. 2012; Mohamad vd. 2015).
- iv. Çapraz Bağlanma: Adsorplanmış biyomateryallerin stabilizasyonu için kullanışlı bir metottur. Substrat çözeltisinin içine enzim kaybını önlemek için destek gerektirmemektedir. Bu yöntemde genellikle biyomateryal kimyasal olarak katı desteğe bağlanmakta ya da çapraz bağlayıcı ajan gibi bir diğer destek materyali bağlantıyı önemli ölçüde arttırmak için eklenmektedir (Singh vd. 2008; Zhao ve Jiang 2010; Datta vd. 2012; Mohamad vd. 2015).

### 1.2.1.2 Tüm Hücre Temelli Biyosensörler

Önceleri biyosensörlerin pratik uygulamaları glikoz ve pH ölçümleri gibi çok az spesifik örnek ile sınırlandırılmıştır. Biyosensör alanı, biyoreseptör olarak hücreler gibi komplekslerin kullanılmasıyla ilgi çekici bir hal almıştır (Ziegler 2000). Tüm hücre temelli biyosensörlerde; enzimler, proteinler ya da DNA gibi spesifik biyomoleküller yerine tekli mikroorganizmalar veya dokular gibi canlı hücreler kullanılmaktadır (Borisov ve Wolfbeis 2008). Farklı analitlerdeki hücrelerden hücre içi ve hücre dışı elektrik sinyalleri elde etmek için farklı olasılıklar bulunmaktadır. Bunlar; cam pipetlerle hücre dışı iyon kayıtları tutulması, transmembran potansiyelinin izlenmesinin hücre içi kayıtların tutulması ve iyon kanallarının bireysel izlenmesi için patch (yama) kenetleme tekniği veya hücre dışı kayıtlar için mikroelektrotların kullanılmasıdır. Hücre temelli biyosensörler sadece biyolojik olarak aktif ve fonksiyonel analitlere cevap vermektedirler (Göpel ve Heiduschka 1995; Pancrazio vd. 1999; Reshetilov vd. 2010). Tüm hücre temelli biyosensörlerde; siyanobakterler, algler, mayalar, mantarlar ve bitki hücreleri gibi farklı tipteki tüm hücreler kullanılmaktadır (Teo ve Wong 2014). Ayrıca tüm hücreler (bakteri, maya, mantar, bitki ve hayvan hücreleri) genel metabolik durumlarını sorgulayarak biyoreseptör olarak kullanılmaktadırlar. Bu durum genellikle oksijen veya substrat tüketimini, karbondioksit veya metabolitlerin üretimini, bakteriyel lüminesansın tespit edilmesini veya elektron taşıma sistemindeki doğrudan elektrokimyasal örneklerin bulunmasını içermektedir (Murugaboopathi vd. 2013).

Biyoreseptör olarak bozulmamış hücre ya da dilimlenmiş doku kullanmanın en az üç büyük avantajı bulunmaktadır. Bunlardan ilki; toksisite, mutajenlik veya farmakolojik

aktivite gibi grup etkileri, sensör teknolojisi kullanılarak ölçümlere ulaşılabilir hale gelmektedir. İkincisi; cihazın hassaslığını arttırmak için dahili amplifikasyon basamakları kullanılabilir. Üçüncü bir avantajı ise; tüm hücreler kendi kendine yaşamlarını sürdürebilen en küçük canlılar olmasıdır (Ziegler 2000).

### 1.2.1.3 Afinite Biyomolekül Temelli Biyosensörler

Afinite biyomolekül temelli biyosensörler, sinyal dönüştürücüye arayüz olan antikor, reseptör protein, biyomimetik materyal veya DNA gibi biyoreseptörlerden oluşan ve analit konsantrasyonunu ölçülebilir elektronik sinyallerle ilişkilendirebilen sitokiyometrik bağlanma olayının meydana geldiği analitik cihazlardır. Bu tip biyosensörlerin en büyük avantajı; geniş afinite aralıklarına sahip olmalarıdır. Bu sayede seçici olarak tespit edilebilen analitlerin sayısı artmaktadır. Bu durum özellikle antikorlar algılama tabakası oluşturduklarında doğru olmaktadır (Marcoy ve Barcelo 1996; Rogers 2000; Raba vd. 2013).

Afinite temelli biyosensörler, hedef analitteki ayrılmayı azaltmak ve birleşmeyi arttırmak için tasarlanmışlardır. Bu nedenle bu sensörler doymuş hale gelmektedir ve zamanla analit seviyesindeki dalgalanmalar hakkındaki dinamik (kinetik) bilgi sağlanamamaktadır (Liu vd. 2012). Antikor temelli biyosensörler, yüksek afinite özellikleri, çok yönlülükleri ve ticari olarak uygulanabilirlikleri nedeniyle afinite biyomolekül temelli biyosensörlerin en çok kullanılan çeşididir (Rogers 2000).

Reseptör temelli biyosensörler yaygın olarak kullanılmayan biyosensörlerdir. Bunun nedeni; tasarımı zor cihazlar olmaları ve biyolojik reseptör protein ya da dokuların zor elde edilmeleri ve stabil olmamalarıdır (Rogers 2000).

Nükleik asit temelli biyosensörler (DNA temelli biyosensörler olarak da bilinmektedirler), bakteri gibi türlerin immünolojik olarak algılanmalarına alternatif bir yaklaşım olarak gösterilmektedirler. Nükleik asitlerin olağanüstü uzun süreli stabilite ve polinükleotidlerin tamamlayıcı zincirlerinin etkileşiminin yüksek seçiciliği nükleik asit temelli biyosensörlerin avantajıdır (Borisov ve Wolfbeis 2008). DNA affinite bazlı biyosensörler, ön teşhisi, bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve kontrolünü gerçek zamanlı ve yerinde sağlayan cihazlardır. DNA sensörler; genetik hastalıkların tanısı, enfeksiyon ajanları ve çevresel durumların saptanması gibi çeşitli potansiyel uygulamaları kapsamaktadır (Rao vd. 2011).

Nükleik asit temelli biyosensörler; geleneksel nükleik asit analizlerine göre daha hızlı, daha basit ve daha ucuz bir şekilde sekans spesifik bilgileri elde etmelerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler. Ayrıca ekonomik avantajı dışında, moleküler düzeyde DNA tanıma ve sinyal iletim elemanları arasında arayüz oluşturmak için yenilikçi yöntemler sunmaktadır (Wang 2002).

## 1.2.2 Fiziksel Transduserlerine Göre Biyosensörler

### 1.2.2.1 Elektrokimyasal Transduserli Biyosensörler

Elektrokimyasal sensörler, analit konsantrasyonu ile orantılı elektrik sinyali üretmek için ilgili analit ile



reaksiyona girerek çalışmaktadırlar. Tipik bir elektrokimyasal sensör, algılayıcı elektrot (çalışma elektrodu) ve elektrolitten ayrılmış referans elektrottan oluşmaktadır. Çoğu uygulama için, üç elektrotlu sistem, yüksek girdi empedanslı bir potansiyostata bağlı referansla kullanılmaktadır ve hem akım hem de devrenin tamamlanması için bir karşıt elektrot kullanılmaktadır. Bu sensörler, enzimler ve hücreler gibi biyolojik komponentlerin aksiyonuyla elektroaktif türlerin üretim ya da tüketimlerinin izlenmesine dayanmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler, özellikle glukoz izlenmesinde yüksek pazar payına sahip biyosensörlerdir (Towseef vd. 2013; Hammond vd. 2016).

Potansiyometri, duyuusal analizlerde köklü bir yere sahip olan en eski enstrümental yöntemlerden biridir. Bu analitik teknik, çeşitli konsantrasyonlarda çeşitli iyonların belirlenmesini sağladığı ve ekonomik ölçüm ekipmanı kullanıldığı için pratik uygulamalarda ilgi çekici bir araçtır. Potansiyometrik biyosensörler, iyon seçici elektrotları biyolojik reaksiyonu bir elektrik sinyaline dönüştürmek için kullanılmaktadırlar (Chaplin ve Bucke 1990; Koncki 2007; Meena ve Rajendran 2010; Yin ve Qin 2013). Cam elektrotları, metal oksit esaslı sensörleri ve iyon seçici elektrotları içeren hemen hemen tüm potansiyometrik sensörler piyasada bulunmaktadır (Koncki 2007). Potansiyometrik biyosensörler; yüksek seçicilikleri, düşük maliyetleri ve basit olmaları nedeniyle çevre, sağlık ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Koncki 2007; Meena ve Rajendran 2010; Yin ve Qin 2013).

Amperometrik sensörler, heterojen elektron transfer reaksiyonlarına, yani elektroaktif maddelerin oksidasyonunu ve indirgenmesini temel almaktadırlar (Scheller ve Schubert 1992). Transduser olarak amperometrinin kullanımı yaygındır. Prensipte amperometrik biyosensörlerin çalışması; çalışma ve referans elektrot arasında uygulanan sabit potansiyel ile tanımlanmaktadır. Yüklenen potansiyel, net bir akımın akmasına neden olan redoks reaksiyonlarını teşvik etmektedir. Akımın büyüklüğü, çözeltide bulunan elektroaktif türlerin konsantrasyonu ile orantılıdır. Hem katodik (indirgeyici) hem de anodik (oksitleyici) reaksiyonlar amperometrik olarak izlenebilmektedir (Towseef vd. 2013).

Amperometrik biyosensörler, algılama yüzeyindeki elektroaktif türlerin neden olduğu biyolojik tanıma olaylarını, bir numune matrisi içindeki bir analitin nicelleştirilmesi için bir akım sinyaline dönüştüren bir elektrokimyasal biyosensör sınıfıdır. Amperometrik biyosensörlerin; çevresel, klinik ve endüstriyel amaçlar için uygun, yüksek hassaslıkta ve güvenilir olduğu bilinmektedir. Clark ve Lyons'un yayınından itibaren, amperometrik biyosensörler popüler ve perspektif eğilimlerden biri haline almıştır (Clark ve Lyons 1962; Meena ve Rajendran 2010; Hammond vd. 2016).

Kalorimetrik biyosensörler, biyolojik reaksiyon boyunca üretilen veya tüketilen ısının belirlenmesine yönelik tasarlanmış dönüştürme yöntemine dayanan sensörlerdir. Birçok biyokimyasal reaksiyon, hassas ısı belirleme aygıtları kullanılarak ısının absorpsiyonu ya da üretilmesi eşliğinde verilmektedir (Towseef vd. 2013; Kulkarni vd. 2014).

### 1.2.2.2 Optik/Optoelektronik Transduserli Biyosensörler

Optik biyosensörler; biyomedikal araştırmalar, sağlık hizmeti, tıbbi ürünler, çevre izlenmesi, ulusal güvenlik ve savaş alanlarında geniş uygulamalara sahip güçlü algılama ve analiz cihazlarıdır. Elektromanyetik parazitlerden etkilenmezler, uzaktan algılama yapabilmektedirler ve tek bir cihazda çoklu algılama sağlayabilmektedirler (Fan vd. 2008). Optik biyosensörlerin avantajları; hızlı olmaları, sinyalin elektriksel ya da manyetik parazitlere karşı dayanıklı olması ve yüksek bilgi içeriği potansiyeline sahip olmasıdır. Optik transduserler; absorban, floresan/fosforesans, kemilüminesans, reflektans, ışık saçılımı veya kırılma indisindeki değişiklikleri belirleyebilmektedirler (Garcia 2009).

Genel olarak belirleme protokolleri; floresan temelli ve etiketsiz belirleme olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Floresan temelli belirlemede, hem hedef moleküller hem de biyolojik tanımlayıcı moleküller boyalar gibi floresan etiketleriyle etiketlenirler; floresan yoğunluğu hedef moleküllerin varlığını ve hedefle biyoreseptör arasındaki etkileşimin kuvvetini belirtmektedir. Etiketsiz belirlemede; hedef moleküller etiketlenmez ya da değiştirilmez ve doğal formlarında belirleme yapılmaktadır. Bu tip belirleme kolay ve ucuzdur ve moleküler etkileşimin kantitatif ve kinetik ölçümüne izin vermektedir (Fan vd. 2008; Garcia 2009). Optik sensörler, başlangıçta oksijen, karbondioksit ve pH için geliştirilerek floresan ve ışıldayan optrodoların yapımına kadar genişletilebilmiştir. Seçici biyolojik bileşen, optik fiberin ucundan ve diğer uca yerleştirilmiş uyarı ve belirleme komponentleri immobilize olmuştur (Luong vd. 1997).

Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance-SPR), kimyasal algılama alanında optik bir tekniktir. Yüzey plazmon rezonans, metal yüzeyin optik aydınlatması sırasında ortaya çıkan bir fenomendir ve bu biyomoleküler etkileşim analizi için uygulanabilmektedir. Yüzey plazmon rezonans için en iyi tanımlama; karşıt yüklü dielektrik sabitlerle iki ortam arasındaki ara yüzeyde yük yoğunluğu salınımidir. Plazmonlar, yüzey metal katmandaki uyarılmış serbest elektron kısmını ifade etmektedir. Yüzey plazmon rezonansı uyarmak için dört temel yöntem bulunmaktadır. Bunlar; prizma kuplajı, dalga kılavuzu kuplajı, fiber optik kuplaj ve ızgaralı kuplajdır. Uygun koşullar altında ince metal filmin yansıma özelliği, ortamın bir tarafındaki optik farklılıklara karşı oldukça hassastır. Bunun nedeni ise yüzey plazmonlarının sınır koşullarının hassas problemleri olmasıdır (Liedberg vd. 1983; Leonard vd. 2003; Fan vd. 2008).

### 1.2.2.3 Piezoelektrik Transduserli Biyosensörler

Piezoelektrik prensiplere dayalı sensörler, piezoelektrik materyal aracılığıyla dalga yayılımındaki rezonans frekansındaki değişiklik için kullanılmaktadırlar. Bu prensipler, sensör yüzeyindeki kütle, viskozite veya yoğunluk değişimlerini ölçmek için kullanılabilirler (Tothill 2001). Piezoelektrik dönüştürücüler, bağışıklık algılama uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tip dönüştürücü kullanmanın avantajları; gerçek

zamanlı izleme, etiketsiz belirleme ve kullanım kolaylığı sağlamasıdır. Ancak hassaslık ve spesiflik özelliklerinin eksikliğini üstesinden gelmek gerekmektedir. Ayrıca piezoelektrik biyosensörlerde format ve kalibrasyon sorunları bulunmaktadır. Bu nedenle piezoelektrik biyosensörler, optik ve elektrokimyasal biyosensörlere göre daha az dikkat çekmektedirler (Luong vd. 1997; Mello ve Kubota 2002; Marrazza 2014).

Piezoelektrik etkiden yararlanmak için genel yaklaşım piezoelektrik kristali, antikolar veya enzimler gibi biyolojik malzemelerle yani hedef molekül için yüksek seçiciliğe sahip bileşiklerle kaplamaktır (Babacan vd. 2000). Piezoelektrik kuartz kristal sensörleri basitlikleri nedeniyle biyoanalitik analizler için ve biyomoleküler etkileşimlerin karakterizasyonu için rekabetçi cihazlar olarak büyük önem taşımaktadırlar. Bu biyosensörlerde biyoreseptör kuartz kristalde immobilize haldedir ve bu da harici alternatif elektrik alanının uygulanmalarında rezonans üretmektedir. İki interaktif molekül arasındaki; biri yüzey üzerine immobilize edilmiş ve diğeri çözültü veya gaz fazında serbest olan biyospesifik reaksiyon, gerçek zamanlı olarak takip edilebilmektedir (Marcoy ve Barcelo 1996; Marrazza 2014).

#### 1.2.2.4 Termal Transduserli Biyosensörler

Termometrik ölçümler, biyokimyasal reaksiyon sırasında verilen veya absorbe edilen ısının ölçümüyle ilgilidir. Toplam ısı verme veya absorpsiyonu molar entalpi ile orantılıdır ve biyokimyasal tepkimede yaratılan toplam ürün moleküllerinin sayısıdır. Termal biyosensörler, ısının verilmesi ve absorpsiyonu gibi biyolojik reaksiyonların temel özelliklerinden faydalanılmaktadırlar (Luong vd. 1997; Ramanathan ve Danielsson 2001).

Termal transduserler ayrıca antikör-antijen etkileşimlerinin belirlenmesi için de uygulanmıştır ve bu teknik, Termometrik Elisa Testi olarak da bilinmektedir. Ancak sofistike kullanımı ve pahalı enstrümantasyon bu tekniğin en büyük dezavantajıdır (Luong vd. 1997).

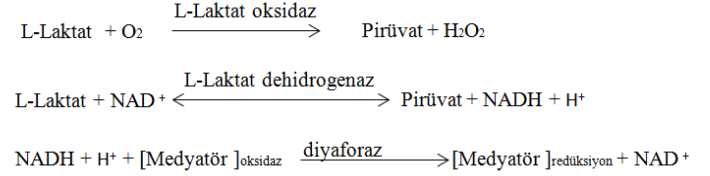
#### 1.3 Laktat Biyosensörleri

Laktat, anaerobik metabolizma yolunun anahtar metabolitidir. Dokuların enerji isteği aerobik solunumla karşılanamadığında anaerobik metabolizmadaki laktat konsantrasyonunda artış meydana gelmektedir (Nikolaus ve Strehlitz 2008; Rathee vd. 2016).

Laktik asit; L (+) ve D (-) ayna görüntülerine sahiptir. L (+) laktat memeli metabolizmasında ara ürünken; D (-) laktat ise genellikle mikroorganizmalar, algler ve bitkiler tarafından üretilmekte olup insanlar tarafından kullanımı sınırlıdır. Ayrıca bazı mikroorganizmalar; özellikle laktik asit bakterileri, rasemik karışım olarak her iki ayna görüntüsünü de üretmektedirler. Laktat, farklı ortamlardaki L ve D laktik asitlerinin varlığının ya da üretiminin belirlenmesi veya izlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Mazzei vd. 1996; Nikolaus ve Strehlitz 2008).

Laktik asidin belirlenmesinde; düşük maliyeti, kullanım kolaylığı, mükemmel hassaslığı ve iyi seçiciliği nedeniyle elektrokimyasal biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde laktat biyosensörlerin çoğu

amperometrik transduserli ve enzim temelli biyosensörlerdir (enzimatik amperometrik biyosensörler). Enzim temelli laktat biyosensörleri içerisinde enzimatik reaksiyonlarının ve tasarımının basit olmasından dolayı en yaygın kullanılan biyosensörler; immobilize laktat dehidrogenazı (LDH) veya laktat oksidazı (LOD) temel alan biyosensörlerdir; (Yang vd. 1999; Tsai vd. 2007; Romero vd. 2008; Ibupoto vd. 2012; Pérez vd. 2012; Sun vd. 2015; Rathee vd. 2016). Biyosensörlerle laktat belirlenirken temel alınan reaksiyonlar Şekil 3'de görülmektedir (Monosik vd. 2012).



Şekil 3. Biyosensörlerle laktat belirlenirken temel alınan reaksiyonlar (Monosik vd. 2012)

Laktat biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik artan ilgi bu analitin biyomarker olarak kullanıma potansiyelinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Hedef analitteki laktat konsantrasyonunun sensörlerle belirlenmesinden; hasta sağlığı koşullarının gözlemlenmesi için klinik teşhislerde, cerrahide sürekli gözlem için hastalık araştırmalarında, spor hekimliğinde, şok/travma vakalarında, gıda endüstrisinde; fermantasyon sürecinin bir göstergesi olarak ve domates sosları, meyveler, meyve suları, şarap ve süt gibi ürünlerin tazelik, stabilite ve depolama kalitesini belirlenmesi amaçlarıyla yaygın olarak faydalanılmaktadır (Tsai vd. 2007; Rassaei vd. 2013; Casero vd. 2014; Rathee vd. 2016).

Ticari olarak kullanılan laktat biyosensörleri (Luong vd. 2008; Przybył 2014):

- YSI 2300 STAT™ Plus Glucose & Lactate Analyzer – Klinik Analizler
- YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer – Biyoproses Kontrolü, Gıda ve İçeceklerin Analizleri
- YSI 7100 Multiparameter Bioanalytical System – Biyoanalizler
- YSI 1500 SPORT™ Lactate Analyzer – Spor Hekimliği
- Stat Profile® Critical Care Xpress ve Stat Profile® pHox – Klinik Analizler
- BioProfile® Analyzers – Biyoproses Kontrolü
- Lactate Plus – Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
- i-STAT® - Klinik Analizler (Bakım Noktası ve Acil Servis)
- Biosen C\_Line ve Biosen S\_Line – Klinik Analizler
- Lactate SCOUT – Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
- Lactate Pro LT-1710 – Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
- Accutrend® Plus – Klinik Analizler (Bakım Noktası)



- Accutred® Lactate – Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
- SensoStar – Klinik Analizler
- Powerlact® – Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
- The Edge™ – Personel Kullanımı (Spor Hekimliği)
- LABTREND – Klinik Analizler
- LACPRO – Klinik Analizler (Taşınabilir)
- OLGA (On Line General Analyser) – Biyoproses Kontrolü
- Labo TRACE Klinik Analizler
- TRACE C2
- Process TRACE Biyoproses Kontrolü
- Multi TRACE
- Wine checker “Per Bacco” – Şarap Analizi
- Senzytec 1 – Şarap Analizi

### 1.3.1 Gıda Endüstrisinde Laktat Biyosensörleri

Laktat (D (-) ve L(+) laktik asit); yoğurt, ayran veya peynir gibi fermente süt ürünlerinde; lahanaya turşusu veya Kore Kimchi'si gibi fermente sebze ürünlerinde ve birçok gıdada ve içeceklerde bulunmakta olup doğal olarak laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedir. Dolayısıyla gıda endüstrisinde laktat seviyesi; fermente süt ürünlerinin, meyve, sebze, et ve şarapların tazelik, stabilite ve kalite özelliklerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Aynı zamanda laktat, asit düzenleyici ya da aroma düzenleyici olarak (E270) ve gıda koruyucusu olarak (sodyum laktat formu) da kullanılmaktadır (Mazzei vd. 1996; Nikolaus ve Strehlitz 2008; Pérez vd. 2012; Rassaei vd. 2013).

Şarap endüstrisinde, malolaktik fermantasyon sırasında malolaktik asit laktik aside dönüşmektedir. Bu fermantasyon, asidin giderilmesini ve şarabın tadının yumuşamasını sağlamaktadır. Bundan dolayı fermantasyon süresince laktik asit seviyesinin izlenmesi şarap kalitesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Pérez vd. 2012; Rassaei vd. 2013).

Balık yetiştiriciliği endüstrisinde, çiftlik verimliliğini artırmak için çok sayıda balık genellikle sınırlı bir alanda yetiştirilmektedir. Bu durum, yaşam kalitesinin düşük olmasına ve balıkların strese ve hastalığa maruz kalmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla kandaki laktat seviyesi, gıda güvenliği ve kalitesini sağlamak için deniz ürünleri endüstrisinde stres işareti olarak kullanılabilir (Rassaei vd. 2013).

Bunlar dışında gıda maddelerinde istenmeyen laktat oluşumu da söz konusu olmaktadır. Yumurta endüstrisinde, L-laktatta meydana gelen artış kontaminasyon ya da kuluçkadan kaynaklı bozulmaların göstergesidir. Yine UHT sütlerde L-laktat artışı bozulma işaretidir. D-laktat, vakumlu paketlenmiş ve dondurulmuş et ürünlerinin tazeliğinin azalmasına ve domates, domates salçası, domates suyunun bakteri kontaminasyonunun rasemik karışımının iyi bir göstergesidir. Meyve sularının laktik asit üreten bakterilerle fark edilmeden uzun süre kontamine olması, bakterilerin yayılmasına ve büyük hacimde meyve suyuna enfekte olmasına neden olmaktadır. Bu da meyve suyunun organoleptik özelliklerinin değişmesine ve tüketim süresinin kısalmasına neden olmaktadır. Şaraplarda da D-laktik asit üretimi, şarabın bozulma göstergesidir (Nikolaus ve Strehlitz 2008; Przybył 2014).

Gıda endüstrisinde kullanım için geliştirilen bazı laktat biyosensörleri:

- 1995 yılında Botre ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; tüm domates, doğranmış domates, domates salçası ve domates suyu örneklerinde D (-) ve L(+) laktik asidi belirleyen çoklu enzim biyoelektrodu geliştirmişlerdir. Bu biyosensörün prensibi; L (+) - laktik asit oksidaz (LOD), n (-) - laktik asit dehidrojenaz (D-LDH) ve yaban turbu peroksidazı (HPO) enzimlerinin katalitik aktivitesine dayanmaktadır. Bu üç enzim amperometrik oksijen seçici elektrodun ucunda immobilize halde bulunmaktadır (Mazzei vd. 1996).
- 1997'de Blanco ve arkadaşları elma şarabındaki laktik asit miktarını belirlemek için; glutamik piruvik transaminaz (GPT) ve L-laktat dehidrojenaz (LDH) enzimlerini nikotinamid adenin dinükleotid (NAD+) kofaktörü ile elektrolit polimerize poli (o-fenilendiamin) (PPD) film kullanarak karbon macun içinde immobilize ettikleri reaktifsiz laktat amperometrik biyosensör geliştirdiklerini belirtmişlerdir (Lobo-Castañón vd. 1997).
- 1999 yılında Serra B. ve arkadaşları, şarap ve yoğurt gibi gıda ürünlerindeki L-laktat tayini için kesikli ve akış enjeksiyon modlarını kullanarak; laktat oksidaz (LOD) ve peroksidazın mediyatör ferrosen ile birlikte elektrot matrisi içine dahil edildiği bir bienzim amperometrik grafit-teflon kompozit biyosensör geliştirmişlerdir (Serra vd. 1999).
- Yine 1999 yılında Katrlık ve arkadaşları, şaraptaki L-malat ve L-laktat miktarını belirlemek için; 2 heksadekanon, grafit ve NAD gibi hidrofobik iskelete sahip katı bağlayıcı matrisle kapladıkları transduser kullandıkları, L-malat veya L-laktat dehidrojenaz ve diyaforaz enzimlerin diyaliz membran ile kaplanarak transduserin yüzeyine yerleştirdikleri ve aracı olarak Heksasiyanoferrat (III) kullanılan bir biyosensör geliştirmişlerdir (Katrlık vd. 1999).
- 2000 yılında Girotti ve arkadaşları daha önce klinik örneklerdeki D- ve L-laktat tayini için geliştirilen biyoluminesan akış sensörünü pH ve dilüsyonunu modifiye ederek bira için geliştirip yayınlamışlardır. Bu biyosensörde; naylonla immobilize edilmiş D- ve L-laktat dehidrojenaz tarafından üretilen azaltılmış nikotinamid adenin dinükleotidini, ayrı bir naylon bobin üzerinde immobilize edilen bakteriyel biyoluminesan enzimler aracılığıyla izlenmektedir (Girotti vd. 2000).
- 2001 yılında Avramescu ve arkadaşları şarap kalitesinin şarabın organoleptik özellikleri belirlenerek izlenmesi için D-laktat ve asetaldehit tayin eden ekran baskılı elektrotlara ve NAD+ bağımlı dehidrojenazlara dayanan biyosensör geliştirmişlerdir (Avramescu vd. 2002).
- Kriz ve arkadaşları 2002 yılında, domates püresi ve bebek mamalarındaki çözülmuş L-laktat miktarını; SIRE tabanlı (tanıma elemanının enjeksiyonuna temel alan sensör) biyosensör

kullanılarak belirlenmişlerdir. Bu biyosensörün ölçme prensibi; bir dahili dağıtım akış sistemine enjekte edilen ve yarı geçirgen bir membran kullanılarak amperometrik transdüser ile doğrudan mekansal temas halinde tutulan az miktarda enzimin kullanımına dayanmaktadır (Kriz vd. 2002).

- 2005-2006 yılında Parra ve arkadaşları şarap ve bira tayinine uygun laktat biyosensörü tasarlamışlardır. Bu biyosensör, doğrudan adsorpsiyon ve kovalent bağlanma dahil olmak üzere iki farklı stratejiyi kullanarak laktat oksidazın (LOx) immobilizasyonu yoluyla geliştirilmiştir. Ortaya çıkan laktat oksidaz mono tabakalarının karakterizasyonu, atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve kuartz kristal mikrobalsans (QCM) teknikleri kullanılarak sulu fosfat tampon çözeltileri içinde gerçekleştirilmiştir (Parra vd. 2006).
- 2008 yılında Ballesta-Claver ve arkadaşları laktat için yeni bir kimyasal lüminesans tabanlı tek atışlı biyosensör tanımlamışlardır. Laktat tanıma sistemi, laktat oksidaza (LOx) dayalıdır ve transduksiyon sistemi; bir poliyon kompleks membranda immobilize olan luminol, *Arthromyces ramosus*'tan (ARP) peroksidaz ve metalik alüminyumdan oluşmaktadır (Ballesta-Claver vd. 2008).
- Sheng Li ve arkadaşları 2008 yılında sütlü içeceklerdeki laktat miktarını ölçmek için; immobilize enzim floresan kapiler analiz (IE-FCA) temelli biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensörde laktik dehidrojenaz (LDH), kapilerin iç yüzeyine glutaraldehitte immobilize edilmiştir ve laktik asit tayini için immobilize enzim laktat kapiler biyoreaktör (IE-LCBER) oluşturulmuştur (Li vd. 2008).
- 2009 yılında Rahman M. M. ve arkadaşları ticari süt ve insan serumu örneklerinde L-laktat konsantrasyonunu belirlemek için; LDH ve NAD<sup>+</sup>'nin birlikte immobilize edildiği karboksilik asit fonksiyonlu iletken polimer / CNT kompozit filmi temel alınan amperometrik laktat biyosensörü geliştirmişlerdir (Rahman vd. 2009).

Gıda Endüstrisi'nde ticari olarak kullanılan önemli laktat biyosensörleri ve uygulanan alanlar (Luong vd. 1997; Prodromidis ve Karayannis 2002; Bahadır ve Sezgintürk 2015);

- YSI 2700 Seçici Gıda Analiz Cihazı-Öğlen eti
- ABD 3000 Biyosensör Analiz Sistemi
- Bio Profile Kimya Analiz Cihazı-Hücre kültürü ve fermantasyon prosesinde analitlerin belirlenmesi
- Sycopel Mikrodiyaliz Biyosensörü-Genel uygulamalar
- FAIZA 110-P-Fermantasyon prosesindeki genel uygulamalar
- PM-1000, PM-1000DC Analiz Cihazları; M-100, AS-200 Analiz Cihazları-Gıda analizleri
- LM58 Laktat Analiz Cihazı-Süt ürünleri
- Enzim Membranları-Genel uygulamalar
- Kalın Film Biyosensörü-Bazı analiz cihazları tedarikçisi

- Biosen 5040-Genel uygulamalar
- PerBaco 2000-Şarap
- PerBaco 2002-Şıra

### 1.3.2 Sağlık Alanında Laktat Biyosensörleri

Anaerobik koşullar altında laktat üretimi, insan performans seviyelerinin, yorulmanın ve hidrasyonun göstergesidir. Yüksek laktat seviyeleri, konjestif kalp yetmezliği, hipoksi ve diyabetik ketoasidoz, iskemi, felç gibi çeşitli tıbbi durumlardan kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, laktatın gerçek zamanlı olarak saptanması, bu gibi tıbbi durumların, travma sonrası durumların izlenmesi ve yorucu bir faaliyete katılan bir kişinin fiziksel durumunun değerlendirilmesinde yararlı olabilmektedir (Wilson ve Hu 2000; Shah vd. 2007).

Laktat, kaslarda anaerobik glikoz metabolizmasından oluşan önemli bir metabolittir. Hücreler içindeki proton konsantrasyonunun artışı laktat üretimine eşlik etmektedir. Eğer laktat üretim hızı yeterince artış gösterirse, hücresel proton tampon kapasitesi aşılabılır, hücresel pH azalır. Bu biyokimyasal olaylara laktik asidoz denilmektedir. Laktik asidozun azalmış doku oksijenasyonuna, sol ventrikül yetmezliğine ve ilaç toksisitesine eşlik ettiği bilinmektedir (Robergs vd. 2004; Tsai vd. 2007; Rassaei vd. 2013).

Laktat analizi; klinik kimyada çok kullanılmamasına karşın şok ve miyokard enfarktüsü tanısı, neonatoloji ve spor hekimliğinde popülaritesi artmaktadır (Scheller ve Schubert 1992).

Septik şok hastalarında, kan laktat düzeylerinin seri olarak belirlenmesi, çoklu sistem organ yetmezliği ve ölümün iyi bir öngörücüsüdür (Bakker vd. 1996; Tsai vd. 2007). Son yıllarda kan laktat eğrisi ve laktat eşikleri (LT), dayanıklılık performansının teşhisinde önemli hale gelmiştir (Faude vd. 2009).

Sürekli bir laktat sensörü; travmatik yaralanmalara sahip askerlerde veya sivillerde kullanıldığında kan kaybı ve hipoperfüzyonu erkenden bildirecektir. Buna ek olarak, laktat sensörleri, yüksek stresli ortamlarda çalışan bireylerin metabolik izlenmelerinde yararlı olacaktır (House vd. 2007).

Sağlık alanında kullanım için geliştirilen bazı laktat biyosensörleri:

- 1976 yılında La Roche (İsviçre), ilk enzim elektrot temelli laktat biyosensörünü geliştirmiş ve Lactate Analyzer LA 640 ismiyle piyasaya sürmüştür (Scheller ve Schubert 1992; Malhotra ve Chaubey 2003; Thakur ve Ragavan 2013).
- 1993 yılında Faridnia ve arkadaşları; L-laktatın invazif olmayan tayini için bir amperometrik hidrojen peroksit esaslı biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensör, elektrokimyasal etkileşimleri etkili bir şekilde ortadan kaldırmak için bir polikarbonat membran ve bir politetrafloroetilen (PTFE) engelleme membranı arasında immobilize olmuş laktat oksidazı kullanmaktadır (Faridnia vd. 1993).
- 1993- 1995 yıllarında Kyrolainen ve arkadaşları açık kalp ameliyatı sırasında kan laktatını izlemek için bir çevrimiçi biyosensör sistemi geliştirmişlerdir, Meyerhoff ve arkadaşları kan

laktatının sürekli izlenebilmesi için bir kateter temelli taşınabilir biyosensör geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Baker ve Gough implante edilebilir laktat sensörünü tanıtmışlardır (Wang 1999).

- 1997 ve 1998 yıllarında beyin biyosensörleri ile laktat izlemine içeren az sayıda da olsa çalışmalar yapılmıştır (Shram vd. 1998; Wilson ve Hu 2000; 2002).
- 1999 yılında glikoz ve laktatın akışkan-enjeksiyon analizi için luminolün elektrokemilüminesansı temel alınan fiber-optik biyosensör geliştirilmiştir (Mehrvar vd. 2000).
- 2004 yılında Ward ve arkadaşları; kandaki glukoz ve laktat miktarını ölçebilen bükülmüş tel tabanlı mikroelektrodları tasarlamış ve üretmişlerdir (Ward vd. 2004).
- pH ve laktatın deride bulunan ve salgılanmış terle atılan analitler olması nedeniyle miktarlarının belirlenmesinin hastalıkların teşhis ve tedavisine yardımcı olabileceği düşünülmüş ve 2006 yılında karbon nanotüp elektrotlara LOX immobilize edilmiş pH ve laktat tayini gerçekleştiren elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmiştir (Weber vd. 2006).
- Rawson ve arkadaşları 2008 yılında yapmış oldukları çalışmayla in vitro hücre metabolizmasının izlenmesi için karbon mikrobant biyosensör vasıtasıyla laktatın elektrokimyasal olarak ölçülmesini sağlamışlardır. Bu çalışma, laktat tayini için ekran baskı teknolojisine dayanan mikrobant biyosensörlerin üretimi ve kullanımı ile ilgili ilk belge özelliği taşımaktadır (Rawson vd. 2009).
- 2009 yılında Dungchai ve arkadaşları; serumdaki kritik sağlık göstergeleri olan glukoz, laktat ve ürik asit tayini için ilk elektrokimyasal kağıt tabanlı mikroakışkan biyosensörü tasarlamışlardır (Dungchai vd. 2009).
- 2010 yılında Jena ve arkadaşları; mürin / albümin hidrojel matrisinde immobilize edilen laktat oksidaz kullanılan ve laktat miktarını belirleyen bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir (Romero vd. 2010).
- 2013 yılında Wang ve arkadaşları; egzersiz olayları sırasında, kullanıcının cildine uyan, esnek basılı bir geçici transfer dövme elektrokimyasal biyosensörünü kullanarak insan terlemesinde gerçek zamanlı noninvaziv laktat algılamasının ilk örneğini göstermişlerdir (Jia vd. 2013).

Sağlık sektöründe ticari olarak kullanılan bazı önemli laktat biyosensörleri (Bahadır ve Sezgintürk 2015);

- Yellow Springs Instruments – 13L
- Roche, Basel, İsviçre – LA 640
- Eppendorf, Almanya – ECA 20 (ESAT 6660) ve ACC
- Elite glucometer – Lactate Pro LT-1710
- ApexBio, Tayvan – The Edge
- EKF Diagnostics, ABD – Lactate Pro-2 LT-1730 ve Lactate Scout
- Nova Biomedical, ABD – Lactate Plus

## 2.Sonuç

Temel olarak biyoreseptör ve transduser kısımlarından oluşan biyosensörler; kullanım kolaylığı sağlaması, hassas, kesin ve doğru sonuçlar vermesi, hızlı, taşınabilir, küçük ve ekonomik cihazlar olmaları nedeniyle yorucu olan geleneksel analitik metotlar yerine son yıllarda oldukça sık tercih edilen cihazlardır. Bu nedenle gıda ve sağlık alanında da önemli bir gösterge olan ve sürekli izlenmesi gereken laktatın belirlenmesinde biyosensörlerin kullanımı artmaktadır. Laktat, gıda endüstrisinde stabilite ve kalite kontrolü açısından önemli bir belirteç iken sağlık açısından anaerobik koşullarda yüksek seviyede laktat üretimi yorgunluğun ve felç gibi bazı tıbbi durumların habercisi olabilmektedir.

Gıda ve sağlık alanında bu derece önemli olan laktat düzeyinin izlenmesinde yaygın olarak enzim biyoreseptörlü, amperometrik transduserli biyosensörler hem laboratuvar düzeyinde hem de ticari olarak kullanılmaktadır.

## Kaynaklar

- Aksoy S, Tumturk H, Hasirci N. 1998.** Stability of Alfa-Amylase Immobilized on Poly(Methyl Methacrylate-Acrylic Acid) Microspheres. *J Biotechnol*, 60/1–2:037–046.
- Alocilja EC, Radke SM. 2003.** Market Analysis of Biosensors for Food Safety. *Biosens Bioelectron*, 18/5–6:841–846.
- Avramescu A, Noguer T, Avramescu M, Marty JL. 2002.** Screen-Printed Biosensors for The Control of Wine Quality Based on Lactate And Acetaldehyde Determination. *Anal Chim Acta*, 458/1:203–213.
- Aykut U, Temiz H. 2006.** Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı. *Teknolojik Araştırmalar : GTED*, 3/3:051–059.
- Babacan S, Pivarnik P, Letcher S, Rand AG. 2000.** Evaluation Of Antibody Immobilization Methods For Piezoelectric Biosensor Application. *Biosens Bioelectron*, 15/11–12:615–621.
- Bahadır EB, Sezgintürk MK. 2015.** Applications Of Commercial Biosensors in Clinical, Food, Environmental, And Biothreat/Bio warfare Analyses. *Anal Biochem*, 478:107–120.
- Bakker J, Gris P, Coffernils M, Kahn RJ, Vincent JL. 1996.** Serial Blood Lactate Levels Can Predict The Development of Multiple Organ Failure Following Septic Shock. *Am J Surg*, 171/2:221–226.
- Ballesta-Claver J, Valencia-Mirón MC, Capitán-Vallvey LF. 2008.** One-Shot Lactate Chemiluminescent Biosensor. *Anal Chim Acta*, 629/1–2:136–144.
- Borisov SM, Wolfbeis OS. 2008.** Optical Biosensors. *Chem Rev*, 108/2:423–461.
- Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F. 2013.** Immobilization Of Enzymes: A Literature Survey. *Methods Mol Biol*, 1051:015–031.
- Canh TM. 1993.** Biosensors. Chapman & Hall, London.
- Casero E, Alonso C, Petit-Domínguez MD, Vázquez L, Parra-Alfambra AM, Merino P, Álvarez-García S, Andrés A, Suárez E, Pariente F, Lorenzo E. 2014.** Lactate Biosensor Based on A Bionanocomposite Composed of Titanium Oxide Nanoparticles, Photocatalytically Reduced Graphene, and Lactate Oxidase. *Microchim Acta*, 181/1–2:079–087.
- Chaplin MF, Bucke C. 1990.** Enzyme Technology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Choi MMF. 2004.** Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers. *Microchim Acta*, 148/3–4:107–132.

- Clark LC. 1956. Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions. *ASAIO Journal*, p:041-048.
- Clark LC, Lyons C. 1962. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann N Y Acad Sci*, 102/1:029-045.
- Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. 2012. Enzyme Immobilization: an Overview on Techniques and Support Materials. *3 Biotech*, 3:001-009.
- Divies C. 1975. Remarks on Ethanol Oxidation by An "Acetobacter xylinum" Microbial Electrode. *Ann Microbiol*, 126/2:175-186.
- Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. 2009. Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. *Anal Chem*, 81/14:5821-5826.
- Fan X, White IM, Shopova SI, Zhu H, Suter JD, Sun Y. 2008. Sensitive Optical Biosensors for Unlabeled Targets: A Review. *Anal Chim Acta*, 620/1-2:008-026.
- Faridnia MH, Palleschi G, Lubrano GJ, Guilbault GG. 1993. Amperometric Biosensor for Determination of Lactate in Sweat. *Anal Chim Acta*, 278/1:035-040.
- Faude O, Kindermann W, Meyer T. 2009. Lactate Threshold Concepts: How Valid Are They? *Sport Med*, 39/6:469-490.
- Girotti S, Muratori M, Fini F, Ferri EN, Carrea G, Koran M, Rauch P. 2000. Luminescent Enzymatic Flow Sensor for D-and L-Lactate Assay in Beer. *Eur Food Res Technol*, 210:216-219.
- Göpel W, Heiduschka P. 1995. Interface Analysis in Biosensor Design. *Biosens Bioelectron*, 10/9-10:853-883.
- Guilbault GG, Montalvo JG. 1970. Enzyme Electrode for the Substrate Urea. *J Am Chem Soc*, 92/8:2533-2538.
- Hammond JL, Formisano N, Estrela P, Carrara S, Tkac J. 2016. Electrochemical Biosensors and Nanobiosensors. *Essays Biochem*, 60:069-080.
- House JL, Anderson EM, Ward WK. 2007. Immobilization Techniques to Avoid Enzyme Loss from Oxidase-Based Biosensors: A One-Year Study. *J Diabetes Sci Technol*, 1/1:018-027.
- Hu Y, Wilson GS. 2002. Rapid Changes in Local Extracellular Rat Brain Glucose Observed with An In Vivo Glucose Sensor. *J Neurochem*, 68/4:1745-1752.
- Ibupoto ZH, Shah SM, Khun K, Willander M. 2012. Electrochemical L-Lactic Acid Sensor Based on Immobilized ZnO Nanorods with Lactate Oxidase. *Sensors*, 12/3:2456-2466.
- Ispas CR, Crivat G, Andreescu S. 2012. Review: Recent Developments in Enzyme-Based Biosensors for Biomedical Analysis. *Anal Lett*, 45/2-3:168-86.
- Jia W, Bandodkar AJ, Valdés-Ramírez G, Windmiller JR, Yang Z, Ramírez J, Chan G, Wang J. 2013. Electrochemical Tattoo Biosensors for Real-Time Noninvasive Lactate Monitoring in Human Perspiration. *Anal Chem*, 85/14:6553-6560.
- Junhui Z, Hong C, Ruifu Y. 1997. DNA Based Biosensors. *Biotechnol Adv*, 15/1:043-058.
- Katrlík J, Pizzariello A, Mastihuba V, Švorc J, Stred'Anský M, Miertuš S. 1999. Biosensors for L-malate and L-lactate Based on Solid Binding Matrix. *Anal Chim Acta*, 379/1-2:193-200.
- Koncki R. 2007. Recent Developments in Potentiometric Biosensors for Biomedical Analysis. *Anal Chim Acta*, 599:007-015.
- Kriz K, Kraft L, Krook M, Kriz D. 2002. Amperometric Determination of L-Lactate Based on Entrapment of Lactate Oxidase on A Transducer Surface with A Semi-Permeable Membrane Using A SIRE Technology Based Biosensor. Application: Tomato Paste and Baby Food. *J Agric Food Chem*, 50/12:3419-3424.
- Kulkarni AS, Joshi DC, Tagalpallewar GP. 2014. Biosensors for Food and Dairy Industry. *Asian J Dairy Food Res*, 33/4:292-296.
- Leonard P, Hearty S, Brennan J, Dunne L, Quinn J, Chakraborty T, O'Kennedy R. 2003. Advances in Biosensors for Detection of Pathogens in Food and Water. *Enzyme Microb Technol*, 32/1:003-013.
- Li YS, Ju X, Gao XF, Zhao YY, Wu YF. 2008. Immobilization Enzyme Fluorescence Capillary Analysis for Determination of Lactic Acid. *Anal Chim Acta*, 610/2:249-256.
- Liedberg B, Nylander C, Lunström I. 1983. Surface Plasmon Resonance for Gas Detection and Biosensing. *Sensors and Actuators*, 4:299-304.
- Liu Y, Matharu Z, Howland MC, Revzin A, Simonian AL. 2012. Affinity and Enzyme-Based Biosensors: Recent Advances and Emerging Applications in Cell Analysis and Point-of-Care Testing. *Anal Bioanal Chem*, 404/4:1181-1196.
- Lobo-Castañón MJ, Miranda-Ordieres AJ, Tuñón-Blanco P. 1997. A Bienzyme-Poly-(O-Phenylenediamine)-Modified Carbon Paste Electrode for the Amperometric Detection of L-Lactate. *Anal Chim Acta*, 346/2:165-174.
- Luong JHT, Bouverette P, Male KB. 1997. Developments and Applications of Biosensors in Food Analysis. *Trends Biotechnol*, 15/9:369-377.
- Luong JHT, Male KB, Glennon JD. 2008. Biosensor Technology: Technology Push Versus Market Pull. *Biotechnol Adv*, 26/5:492-500.
- Malhotra BD, Chaubey A. 2003. Biosensors for Clinical Diagnostics Industry. *Sensors Actuators B Chem*, 91/1-3:117-127.
- Marcy M-P, Barcelo D. 1996. Environmental Applications of Analytical Biosensors. *Meas Sci Technol*, 7:1547-1562.
- Market Research Report Collections. 2014. Adress: <http://www.strategy.com/pressMCP-3310.asp>.
- Marrazza G. 2014. Piezoelectric Biosensors for Organophosphate and Carbamate Pesticides: A Review. *Biosensors*, 4/3:301-317.
- Mazzei F, Azzoni A, Cavalieri B, Botrè F, Botrè C. 1996. A Multi-Enzyme Bioelectrode for The Rapid Determination of Total Lactate Concentration in Tomatoes, Tomato Juice and Tomato Paste. *Food Chem*, 55/4:413-418.
- Meena A, Rajendran L. 2010. Mathematical Modeling of Amperometric and Potentiometric Biosensors and System of Non-Linear Equations – Homotopy Perturbation Approach. *J Electroanal Chem*, 644/1:050-059.
- Mehrvar M, Bis C, Scharer JM, Young MM, Luong JH. 2000. Fiber-Optic Biosensors. *Trends and Advances Anal Sci*, 16/7:677-692.
- Mello LD, Kubota LT. 2002. Review of the Use of Biosensors as Analytical Tools in The Food and Drink Industries. *Food Chem*, 77/2:237-256.
- Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA. 2015. An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 29/2:205-220.
- Monosik R, Stredansky M, Tkac J, Sturdik E. 2012. Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. *Food Anal Methods*, 5/1:040-053.
- Mosbach K, Danielsson B. 1974. An Enzyme Thermistor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 364/1:140-145.
- Moser I, Jobst G, Urban GA. 2002. Biosensor Arrays for Simultaneous Measurement of Glucose, Lactate, Glutamate, and Glutamine. *Biosens Bioelectron*, 17/4:297-302.

- Murugaboopathi G, Parthasarathy V, Chellaram C, Anand TP, Vinurajkumar S. 2013.** Applications of Biosensors in Food Industry. *Biosci Biotechnol Res Asia*, 10/2:711–714.
- Nikolaus N, Strehlitz B. 2008.** Amperometric Lactate Biosensors and Their Application in (Sports) Medicine, for Life Quality and Wellbeing. *Microchim Acta*, 160/1–2:015–055.
- Palleschi G, Mascini M, Bernardi L, Zeppilli P. 1990.** Lactate and Glucose Electrochemical Biosensors for The Evaluation of The Aerobic and Anaerobic Threshold in Runners. *Med Biol Eng Comput*, 28/3:025–028.
- Pancrazio JJ, Whelan JP, Borkholder DA, Ma W, Stenger DA. 1999.** Development and Application of Cell-Based Biosensors. *Ann Biomed Eng*, 27/6:697–711.
- Parra A, Casero E, Vázquez L, Pariente F, Lorenzo E. 2006.** Design and Characterization of A Lactate Biosensor Based on Immobilized Lactate Oxidase Onto Gold Surfaces. *Anal Chim Acta*, 555/2:308–315.
- Pérez S, Sánchez S, Fàbregas E. 2012.** Enzymatic Strategies to Construct L-Lactate Biosensors Based on Polysulfone/Carbon Nanotubes Membranes. *Electroanalysis*, 24/4:967–974.
- Prodromidis MI, Karayannis MI. 2002.** Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis. *Electroanalysis*, 14/4:241–261.
- Przybyt M. 2014.** Lactate Biosensors for Food Industry. *Biotechnol Food Sci*, 78/1:071–088.
- Raba J, Fernández-baldo MA, Pereira S V, Messina G, Bertolino FA, Tosetti S, Ferramola MIS. 2013.** Analytical Biosensors for The Pathogenic Microorganisms Determination. *Microb Pathog Strateg Combat them Sci Techno Educ*, 227–238.
- Rahman MM, Shiddiky MJA, Rahman MA, Shim YB. 2009.** A Lactate Biosensor Based on Lactate Dehydrogenase/Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Oxidized Form) Immobilized on A Conducting Polymer/Multiwall Carbon Nanotube Composite Film. *Anal Biochem*, 384/1:159–165.
- Ramanathan K, Danielsson B. 2001.** Principles and Applications of Thermal Biosensors. *Biosens Bioelectron*, 16/6:417–423.
- Rao VK, Suresh S, Sharma MK, Gupta A, Vijayaraghavan R. 2011.** Carbon Nanotubes - A Potential Material for Affinity Biosensors. *Naraghi M, Carbon Nanotubes - Growth and Applications Chapter7. In Tech*.
- Rassaei L, Olthuis W, Tsujimura S, Sudhölter EJ, Van Den Berg A. 2013.** Lactate Biosensors: Current Status and Outlook. *Anal Bioanal Chem*, 406/1:123–137.
- Rathee K, Dhull V, Dhull R, Singh S. 2016.** Biosensors Based on Electrochemical Lactate Detection: A Comprehensive Review. *Biochem Biophys Reports*, 5:035–054.
- Rawson FJ, Purcell WM, Xu J, Pemberton RM, Fielden PR, Biddle N, Hart J. P. 2009.** A Microband Lactate Biosensor Fabricated Using A Water-Based Screen-Printed Carbon Ink. *Talanta*, 77/3:1149–1154.
- Renneberg R, Lisdat F. 2006.** Biosensing for the 21st Century Volume. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin.
- Reshetilov AN, Iliasov PV, Reshetilova TA. 2010.** The Microbial Cell Based Biosensors. *Intelligent and Biosensors Chapter 15. In Tech*.
- Roberts RA, Ghiasvand F, Parker D. 2004.** Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287/3:502–516.
- Rogers KR. 2000.** Principles of Affinity-Based Biosensors. *Mol Biotechnol*, 14/2:109–130.
- Romero MR, Ahumada F, Garay F, Baruzzi AM. 2010.** Amperometric Biosensor for Direct Blood Lactate Detection. *Anal Chem*, 82/13:5568–5572.
- Romero MR, Garay F, Baruzzi AM. 2008.** Design and Optimization of A Lactate Amperometric Biosensor Based on Lactate Oxidase Cross-Linked With Polymeric Matrixes. *Sensors Actuators B Chem*, 131/2:590–595.
- Rustagi S, Kumar P. 2013.** Advances in Bioresearch Biosensor and It's Application in Food Industry. *ABR Adv Biores*, 4/42:168–170.
- Scheller F, Schubert F. 1992.** *Biosensors*. Elsevier Science Publishing Company Inc, New York.
- Scheper T, Lee K, Kaplan D. 2006.** *Tissue Engineering I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin.
- Serra B, Reviejo AJ, Parrado C, Pingarrón JM. 1999.** Graphite-Teflon Composite Bienzyme Electrodes for The Determination of L-Lactate: Application to Food Samples. *Biosens Bioelectron*, 14/5:505–513.
- Shah N, Lyandres O, Walsh JT, Glucksberg MR, Van Duyne RP. 2007.** Lactate and Sequential Lactate-Glucose Sensing Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal Chem*, 79/18:6927–6932.
- Shram NF, Netchiporouk LI, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Bonnet C, Cespuoglio R. 1998.** In Vivo Voltammetric Detection of Rat Brain Lactate with Carbon Fiber Microelectrodes Coated with Lactate Oxidase. *Anal Chem*, 70/13:2618–2622.
- Singh M, Verma N, Garg AK, Redhu N. 2008.** Urea Biosensors. *Sensors Actuators B Chem*, 134/1:345–351.
- Sun C, Wang D, Zhang M, Ni Y, Shen X, Song Y, Geng Z, Xu W, Liu F, Mao C. 2015.** Novel L-Lactic Acid Biosensors Based on Conducting Polypyrrole-Block Copolymer Nanoparticles. *Analyst*, 140/3:797–802.
- Teo SC, Wong LS. 2014.** Whole Cell-Based Biosensors for Environmental Heavy Metals Detection. *Annu Res Rev Biol*, 4/17:2663–2674.
- Thakur MS, Ragavan K V. 2013.** Biosensors in Food Processing. *J Food Sci Technol*, 50/4:625–641.
- Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. 2001.** Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Biosens Bioelectron*, 16/1–2:121–131.
- Tothill IE. 2001.** Biosensors Developments and Potential Applications in The Agricultural Diagnosis Sector. *Comput Electron Agric*, 30/1–3:205–218.
- Towseef W, Amin QA, Quadir N. 2013.** Role of Biosensors in Agro-Food Technology. *Asian J Home Sci*, 8/1:347–352.
- Tsai YC, Chen SY, Liaw HW. 2007.** Immobilization of Lactate Dehydrogenase within Multiwalled Carbon Nanotube-Chitosan Nanocomposite for Application to Lactate Biosensors. *Sensors Actuators B Chem*, 125/2:474–481.
- Turner APF, Isao K, Wilson GS. 1989.** *Biosensors Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, New York.
- Uygun M, Aktaş Uygun D, Karagözler AA. 2013.** PVA-Aljinat Küreler Üzerine  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Immobilizasyonu. *Tralleis Elektronik Dergisi*, 1:045–050.
- Velasco-Garcia MN. 2009.** Optical Biosensors for Probing at The Cellular Level: A Review of Recent Progress and Future Prospects. *Semin Cell Dev Biol*, 20/1:027–033.
- Velasco-Garcia MN, Mottram T. 2003.** Biosensor Technology Addressing Agricultural Problems. *Biosyst En*, 84/1:001–012.
- Viswanathan S, Radecki J. 2008.** Amperometric Biosensors for Clinical and Therapeutic Drug Monitoring: A Review. *Nanomaterials in Electrochemical Biosensors for Food*

- Analysis - A Review. Polish J Food Nutr Sci, 58/2:157–164.
- Wang J. 1999.** Amperometric Biosensors for Clinical and Therapeutic Drug Monitoring: A Review. J Pharm Biomed Anal, 19/1–2:047–053.
- Wang J. 2002.** Electrochemical Nucleic Acid Biosensors. Anal Chim Acta, 469/1:063–071.
- Ward WK, House JL, Brick J, Anderson EM, Jansen LB. 2004.** A Wire-Based Dual-Analyte Sensor for Glucose and Lactate: In Vitro and In Vivo Evaluation. Diabetes Technol Ther, 6/3:389–401.
- Weber J, Kumar A, Kumar A, Bhansali S. 2006.** Novel Lactate and pH Biosensor for Skin and Sweat Analysis Based on Single Walled Carbon Nanotubes. Sensors Actuators B Chem, 117/1:308–313.
- Wilson GS, Hu YB. 2000.** Enzyme Based Biosensors for In Vivo Measurements. Chem Rev, 100/7:2693–2704.
- Yang Q, Atanasov P, Wilkins E. 1999.** Needle-Type Lactate Biosensor. Biosens Bioelectron, 14/2:203–210.
- Yin T, Qin W. 2013.** Trends in Analytical Chemistry Applications of Nanomaterials in Potentiometric Sensors. Trends Anal Chem, 51:079–086.
- Ziegler C. 2000.** Cell-Based Biosensors. Fresenius J Anal Chem, 366:552–559.