

**T.C.  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
GIDA TEKNOLOJİSİ PROGRAMI**

**BALIKTA TAZELİĞİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK  
BİYOSENSÖR TASARIMI**

**PELİN ÖZKAYA**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi SEVAL DAĞBAĞLI**

**MANİSA 2024**

MANİSA-2024

PELİN  
ÖZKAYA

BALIKTA TAZELİĞİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR TASARIMI

2024

## TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, tezin yazımında akademik ve etik kurallara aykırı herhangi bir yapay zeka ve program kullanmadığımı beyan ederim.

**Pelin ÖZKAYA**



## Doktora Tezi

**Pelin ÖZKAYA**  
**Manisa Celal Bayar Üniversitesi**  
**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**  
**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi Seval DAĞBAĞLI

2024, 94 sayfa

### ÖZET

Kaliteli gıdaya ulaşmak, modern insanın en büyük gereksinimlerinden biri olmakla beraber kalite kavramı, içerisinde pek çok kriteri barındırmaktadır. Özellikle de et, süt ürünleri, deniz ürünleri gibi gıdalar, zengin besin içerikleri nedeniyle çabuk bozulduğu için tazelik, bu gıdaların tüketilebilirliği açısından en önemli kalite kriteri konumundadır. Tazeliğin belirlenmesi ise geçen zamana, balığın çeşitli özelliklerine ve maruz kaldığı koşullara paralel olarak gerçekleşen reaksiyon ve değişimler neticesinde oluşan bazı indikatörlerin tespitiyle mümkün olmaktadır. Bu maddeler içerisinde balığın ölümünü izleyen süreçteki ATP yıkım reaksiyonlarıyla oluşan ksantin, hipoksantin, ürik asit miktarları, en kritik parametrelerden sayılmaktadır. Söz konusu indikatör maddelerin geleneksel analiz yöntemleriyle (spektrofotometrik, kromatografik yöntemler vb.) tayin edilmesinin genellikle zaman alması, özel bir donanım, kalifiye işgücü ve yoğun kimyasal kullanımı gerektirmesi nedeniyle, biyosensör teknolojisinin bu dezavantajları giderebilecek bir alternatif olmasından yola çıkılarak bu tez çalışmasında balığın tazelik kriterlerinden olan ksantin, hipoksantin ve ürik asidin eş zamanlı tayinine yönelik bir biyosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Biyosensör kısaca, hedef analit ile reaksiyona giren ve oluşan yanıtı ölçülebilir fiziksel sinyallere dönüştüren analitik cihaz olarak tanımlanmakta olup, bu çalışma kapsamındaki biyosensör tasarımında düşük maliyetli ve bol bulunan malzemelerin kullanımı esas alınmak suretiyle kalem ucu (PGE) elektrotlar üzerine poliakrilonitril (PAN) polimerinin elektrodeğirilmesiyle dayalı bir elektrokimyasal sensör tasarımı yapılmıştır. Bu tasarım ile elektrokatalitik özelliği yüksek, adsorpsiyon kapasitesi artırılarak analit etkileşimi iyileştirilmiş ve geniş reaksiyon yüzeyi sağlanmış nanomodifiye elektrot yüzeylerinin elde edilmesi hedeflenmiştir. Sensör elektrotlarının üretiminde yararlanılan elektrodeğirme işleminde optimum uygulama parametreleri ve çözelti formülasyonu deneysel olarak belirlenmiş, polipirol kullanılmadan hazırlanan % 8'lik PAN çözeltisi ile 13 cm mesafe, 5 µl/dk debi ve 18 kV voltaj uygulanarak ortalama 137 nm çapında nanoliflerle kaplanan modifiye PGE elektrot yüzeyleri elde edilmiştir. Sensörün hipoksantin, ksantin ve ürik asidi eş zamanlı olarak tayin edebilme yeteneği, ksantin oksidaz enzimi ile gerçekleştirilen kontrollü bozunma çalışmaları ile ortaya konmuştur. Bu tasarım ile elde edilen nanomodifiye yüzeyler ile hipoksantin için 0,74 µM, ksantin için 1,28 µM ve ürik asit için 1,32 µM'lık tespit limitlerine (LOD) ulaşılmıştır. Böylece, literatürde daha önce hiç yapılmamış olan, ilk kez hipoksantin, ksantin ve ürik asidin eş zamanlı tayinine yönelik olarak elektrodeğirilmiş PAN nanolif modifikasyonu ile PGE elektrot üretimine dayalı özgün bir elektrokimyasal (voltametrik) sensör

tasarımı gerçekleştirilmiştir. Söz konusu sensör elektrotlarının 4°C ve 25 °C’de 30 günlük muhafazası sonrasındaki ölüm performansı da değerlendirilmiş ve 4°C’de depolamanın ölümlerdeki sapma oranını azaltarak daha uygun bir muhafaza koşulu olduğu sonucuna varılmıştır. Geliştirilen sensör elektrotları, İzmir’de satılan standart boyutlardaki çiftlik ipura balıklarının tazeliğini belirlemede kullanılmış, sonuçlar mikrobiyolojik analizler ve pH ölümleriyle desteklenmiştir. Balığın buzdolabı koşullarında depolandığı 5. gün itibariyle kabul edilemez duruma geldiği kritik hipoksantin, ksantin ve ürik asit konsantrasyonları sırasıyla 1,53  $\mu\text{M}$  9,41  $\mu\text{M}$  ve 1,41  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Balıkta tazelik, Elektrokimyasal biyosensör, Elektrodeğirme, PAN nanolifler, Hipoksantin, Ksantin, rik asit



## **PhD Thesis**

**Pelin ÖZKAYA**

**Manisa Celal Bayar University  
Graduate School of Education  
Department of Food Engineering**

**Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Seval DAĞBAĞLI**

**2024, 94 pages**

### **ABSTRACT**

Access to quality food is one of the biggest requirements of modern people, but the concept of quality includes many criteria. Freshness is the most important quality criterion in terms of the consumability of these foods, especially since foods such as meat, dairy products and seafood spoil quickly due to their rich nutrient content. Determination of freshness is possible by detecting some indicators that occur as a result of reactions and changes that occur in parallel with the elapsed time, various properties of the fish and the conditions to which it is exposed. Among these substances, the amounts of xanthine, hypoxanthine, uric acid, which are formed by ATP breakdown reactions in the process following the death of the fish, are considered among the most critical parameters. Since the determination of these indicator substances by conventional analysis methods (spectrophotometric, chromatographic methods, etc.) is generally time-consuming, requires special equipment, skilled labor and intensive use of chemicals, biosensor technology is an alternative that can eliminate these disadvantages, and a biosensor was designed for the simultaneous determination of xanthine, hypoxanthine and uric acid, which are among the freshness criteria of fish. A biosensor is briefly defined as an analytical device that reacts with the target analyte and converts the response into measurable physical signals. In the biosensor design in this study, an electrochemical sensor design based on the electrowinning of polyacrylonitrile (PAN) polymer on pencil lead (PGE) electrodes was made based on the use of low-cost and abundant materials. With this design, it is aimed to obtain nanomodified electrode surfaces with high electrocatalytic properties, improved analyte interaction by increasing adsorption capacity and large reaction surface. The optimum application parameters and solution formulation in the electrospinning process used in the production of sensor electrodes were determined experimentally. Modified PGE electrode surfaces coated with nanofibers with an average diameter of 137 nm were obtained by applying 8% PAN solution with a distance of 13 cm, a flow rate of 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  and a voltage of 18 kV. The ability of the sensor to simultaneously determine hypoxanthine, xanthine and uric acid was demonstrated by controlled degradation studies with xanthine oxidase enzyme. With the nanomodified surfaces obtained with this design, limits of detection (LOD) of 0.74  $\mu\text{M}$  for hypoxanthine, 1.28  $\mu\text{M}$  for xanthine and 1.32  $\mu\text{M}$  for uric acid were achieved. Thus, a novel electrochemical (voltammetric) sensor design based on the production of PGE electrodes by modification of electrospun PAN nanofibers for the simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid was realized for the first time, which has never been done before in the literature. The measurement performance of these sensor electrodes after 30 days of storage at 4 °C and 25 °C was

also evaluated. The ratio of deviation in the measurements is reduced at 4 °C, concluding that the electrodes should be kept at 4 °C for a better preservation. The developed sensor electrodes were used to determine the freshness of standard sized farmed sea bream fish sold in Izmir and the results were supported by microbiological parameters and the pH measurements. By the fifth day of storage at refrigerator that the fish became unacceptable, the critical hypoxanthine, xanthine and uric acid concentrations found to be 1,53  $\mu\text{M}$  9,41  $\mu\text{M}$  and 1,41  $\mu\text{M}$  respectively.

**Keywords:** Fish freshness, electrochemical biosensor, electrospinning, PAN nanofibers, hypoxanthine, xanthine, uric acid



## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan balığın tazeliğinin belirlenmesi, gıda güvenilirliği açısından büyük önem taşımakta ve bu amaca yönelik zaman kazandıracak pratik yöntemlere duyulan teknolojik gerekliliği de artırmaktadır. Bu amaca yönelik hızlı, kolay ve ekonomik teknikler içerisinde öne çıkan biyosensör teknolojisi, bu çalışmanın temelini oluşturmuş ve balık etinin tazeliğini belirlemek üzere bir biyosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Tasarım, poliakrilonitril (PAN) polimer çözeltisinin elektroğirme işlemi vasıtasıyla kalem ucu elektrotlar üzerine nano ölçekli lifler halinde kaplanmasına ve balıkta tazelik kriterlerinden olan hipoksantin, ksantin ve ürik asitin nanomodifiye elektrot yüzeyleri ile eş zamanlı olarak tayin edilmesine dayanmaktadır. Buradan yola çıkılarak, bu tez çalışmasında balık eti ve tazelik kriterleri, biyosensör teknolojisi, nanomateryaller ve elektroğirme hakkında bilgiler sunulduktan sonra materyal yöntem detaylandırılmış, deneysel çalışmalar doğrultusunda biyosensörün optimizasyon çalışmaları aktarılmış ve stabilitesi belirlenmiştir. Sonuç itibarıyla, balıktaki tazelik kriterlerinden hipoksantin, ksantin ve ürik asitin eş zamanlı tayinine yönelik olarak geliştirilen ve endüstriye adapte edilebilecek hassas, pratik, ekonomik, dayanıklı ve özgün bir prototip elde edilmiştir.

YÖK 100/2000 Gıda Güvenliği/Gıda Güvencesi Doktora Programı bursiyeri ve TÜBİTAK 2211-A Genel Başarı Bursiyeri olarak tamamladığım doktora eğitimimin sonucunda ortaya çıkan bu tez çalışması, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından 2022-070 no'lu proje kapsamında desteklenmiş ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarları ile Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bu zorlu süreçte tecrübesi ve desteğini sonsuz bir cömertlikle bana sunan, sabrı ve hoşgörüsüyle kucaklayarak en zor anlarda bile başarabileceğime beni inandıran, aynı zamanda en güzel anların ve ödüllendirilmiş başarılarımızın mimarı, çok kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Seval DAĞBAĞLI'ya,

Çok severek çıktığım bu akademik yolculukta elimi ilk tutan, daimi rehberim ve ışığım olan, özgüvenimi ve çalışma şevkimi hep artıran, desteğine layık olmaya çalıştığım çok kıymetli hocam Prof. Dr. Semra KAYAARDI'ya,

Biyosensör çalışmalarını bana tanıtan ve sevdiren, bana güvenen, ekibine dahil ederek imkanlarını sunan ve aileden biri gibi hissettiren çok kıymetli hocam Prof. Dr. Pınar KARA'ya,

Beni yetiştirerek bugünlere getiren, halen emeğini, sevgisini, desteğini ve duasını eksik etmeyen, benimle her zaman gurur duyan ve başaracağıma her zaman inanan Canım Anneciğim ve Canım Babacığım Şükran TALU ve İzzet TALU başta olmak üzere tüm aileme,

Akademik kariyerimin her aşamasında beni tüm içtenliğiyle cesaretlendiren, beni benden iyi tanıyarak mesleğime duyduğum sevgiyi bana hatırlatan, bu yolculuktaki tüm iniş çıkışlarıma sabır gösteren, benimle her zaman gurur duyan ve

bugünü yaşamamdaki en büyük sebeplerimden olan Biricik Eşim Serhat ÖZKAYA'ya ve zaman zaman istemeden de olsa yoğun çalışma temposunda ilgimden mahrum kalmış olan ama benimle gurur duyan, yaşama sevincim Canım Oğlum Emir Kaan ÖZKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Pelin ÖZKAYA  
Manisa, 2024



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ADP</b>	Adenosine Di Phosphate (Adenozin Di Fosfat)
<b>AMP</b>	Adenosine Mono Phosphate (Adenozin Mono Fosfat)
<b>ATP</b>	Adenosine Tri Phosphate (Adenozin Tri Fosfat)
<b>CNF</b>	Carbon Nano Fiber (Karbon Nano Lif)
<b>CNT</b>	Carbon Nano Tube (Karbon Nano Tüp)
<b>CPE</b>	Carbon Paste Electrode (Karbon Pasta Elektrot)
<b>GCE</b>	Glassy Carbon Electrode (Camsı Karbon Elektrot)
<b>DMF</b>	Di metil Formamid
<b>DPV</b>	Diferansiyel Puls Voltametri
<b>EE</b>	Elektrodeğirme
<b>EIS</b>	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
<b>EMS</b>	En Muhtemel Sayı
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organisation
<b>GO</b>	Grafen Oksit
<b>rGO</b>	reduced (indirgenmiş) Grafen Oksit
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi)
<b>HX</b>	Hipoksantin
<b>IN</b>	İnozin
<b>IMP</b>	Inosine Mono Phosphate (Inozin Mono Fosfat)
<b>LOD</b>	Limit of Detection (Tespit Limiti)
<b>LOQ</b>	Limit of Quantification (Miktarsal Tayin Limiti)
<b>MOF</b>	Metal Oksit Çerçeve (Metal Oxide Framework)
<b>MONF</b>	Metal Oksit Nano Fiber (Metal Oksit Nano Lif)
<b>NEAR-MIR</b>	Near- Middle Infrared Technology (Yakın-Orta Kızılötesi Teknolojisi)
<b>PAN</b>	Poli Akrilo Nitril
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution (Fosfat Tamponu Çözeltisi)
<b>PGE</b>	Pencil Graphyte Electrode (Kalem Ucu Elektrot)
<b>POC</b>	Point of Care (Örnek Başında Analiz)
<b>SEM</b>	Scanning Electrone Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
<b>SPE</b>	Screen Printed Electrode (Yazdırılmış elektrot)
<b>TMA</b>	Tri Metil Amin

<b>TVB-N</b>	Total Volatile Basic Nitrogene (Toplam Uçucu Bazik Azot)
<b>UA</b>	Ürik Asit
<b>XN</b>	Ksantin
<b>XOD</b>	Xanthine Oxidase (Ksantin Oksidaz)
<b>0D</b>	0-Boyutlu (Boyutsuz)
<b>1D</b>	Tek Boyutlu
<b>2D</b>	İki Boyutlu
<b>3D</b>	Üç Boyutlu



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Şekil 1.</b> ATP yıkım reaksiyon zinciri ve ksantin oksidoredüktazlar ile gerçekleşen metabolik yol izi	7
<b>Şekil 2.</b> Elektroeğirme cihazı ve Taylor konisi	33
<b>Şekil 3.</b> PGE yüzeylerin elektroeğirilmiş PAN nanolifler ile modifikasyonunda belirlenen üretim parametreleri	34
<b>Şekil 4.</b> Üçlü elektrot sistemi	35
<b>Şekil 5.</b> Yalın PGE (kaplanmamış) elektrot yüzeyi ve elektroeğirilmiş PAN nanolifler ile modifiye edilmiş PGE elektrot yüzeyi	39
<b>Şekil 6.</b> 1. Üretimden elde edilen nanomodifiye PGE elektrodun genel görünümü ve elektrodun bir bölümünden yakınlaştırılmış görüntüsü	41
<b>Şekil 7.</b> 2. Üretimden elde edilen nanomodifiye PGE elektrodun genel görünümü ve elektrodun bir bölümünden yakınlaştırılmış görüntüsü.	42
<b>Şekil 8.</b> % 0,4'lük PPy konsantrasyonu ile üretilen ve yalnızca PAN kullanılarak hazırlanan prekürsör çözelti (PPy=0) ile elektroeğirilmiş PAN nanomodifiyeli PGE elektrot yüzeylerinden bir bölümün SEM görüntüsü	45
<b>Şekil 9.</b> Ksantin 10, 20, 50, 100 ve 200 $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramlar	47
<b>Şekil 10.</b> Hipoksantin 10, 20, 50, 100 ve 200 $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramları	47
<b>Şekil 11.</b> Ürik asitin 10, 20, 50, 100 ve 200 $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramları	48
<b>Şekil 12.</b> Xn, Hx, UA Konsantrasyon Çalışması ve Hata Çubukları	49
<b>Şekil 13.</b> 200 $\mu\text{M}$ 'lık Hx, Xn ve UA Karışımının Voltamogramı	50
<b>Şekil 14.</b> Dopaminin 10, 20, 50, 100 ve 200 $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramlar	52
<b>Şekil 15.</b> L-Aspartik asitin 10, 20, 50 ve 100 $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramlar	52
<b>Şekil 16.</b> 20 $\mu\text{M}$ 'lık eklemeli konsantrasyon çalışması voltamogramı	53
<b>Şekil 17.</b> 50 $\mu\text{M}$ 'lık eklemeli konsantrasyon çalışması voltamogramı	53
<b>Şekil 18.</b> 100 $\mu\text{M}$ 'lık eklemeli konsantrasyon çalışması voltamogramı	54
<b>Şekil 19.</b> PPy kullanılmaksızın (Yalnızca % 8 PAN çözeltisi) hazırlanan çözeltilerden elektroeğirme ile elde edilen elektrotların Hx, Xn ve UA ölçüm performansları, hata çubukları ve $R^2$ değerleri	56
<b>Şekil 20.</b> % 0,4 PPy içeren % 8'lik PAN çözeltisinden elektroeğirme ile elde edilen elektrotların Hx, Xn ve UA ölçüm performansları, hata çubukları ve $R^2$ değerleri	57
<b>Şekil 21.</b> % 0,8 PPy içeren % 8'lik PAN çözeltisinden elektroeğirme ile elde edilen elektrotların Hx, Xn ve UA ölçüm performansları, hata çubukları ve $R^2$ değerleri	57
<b>Şekil 22.</b> Hx, Xn UA ve girişim potansiyeli olan DOP ve L-ASP'in 10, 20, 50, 100 ve 200 $\mu\text{M}$ 'lık karışım çözeltilerinin voltamogramı	60
<b>Şekil 23.</b> Farklı konsantrasyonda XOD enzimi ile muamele edilen Hx çözeltisinin DPV ölçüm sonuçları	62
<b>Şekil 24.</b> 1,1 U'luk XOD enzimi ile farklı sürelerde muamele edilen Hx çözeltisinin DPV ölçüm sonuçları	64
<b>Şekil 25.</b> Analitlerin 1, 2, 5 ve 10 $\mu\text{M}$ 'lık karışım çözeltileriyle elde edilen DPV ölçüm sonuçları	66
<b>Şekil 26.</b> Farklı koşullarda muhafaza edilen elektrotların 10 $\mu\text{M}$ 'lık analit ölçüm performansı	70

## TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
<b>Tablo 1.</b> Literatürde çeşitli numunelerde (kan, idrar, et, balık, vb.) ksantin, hipoksantin ve ürik asit tayinlerine yönelik olarak geliştirilen elektrokimyasal biyosensör çalışmaları	26
<b>Tablo 2.</b> Deneylerde kullanılan çözeltiler ve içerikleri	32
<b>Tablo 3.</b> PAN nanolif üretimlerinin uygulama parametreleri ve elde edilen nanoliflerin çap bakımından karşılaştırılması	40
<b>Tablo 4.</b> PAN nanolif üretimlerinde farklı PPy kullanımına göre elde edilen nanoliflerin çap bakımından karşılaştırılması	44
<b>Tablo 5.</b> Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan analit çözeltileriyle alınan DPV ölçüm sonuçları ve analitlerin pik potansiyelleri	48
<b>Tablo 6.</b> Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan dopamin çözeltileriyle alınan DPV ölçüm sonuçları ve pik potansiyelleri	50
<b>Tablo 7.</b> Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan L-aspartik asit çözeltileriyle alınan DPV ölçüm sonuçları ve pik potansiyelleri	51
<b>Tablo 8.</b> PPy kullanılmaksızın (Yalnızca % 8 PAN çözeltisi) yapılan elektrode edilmiş nanolif modifiyeli elektrot üretimi sonrası analitlerin DPV ölçümlerinden elde edilen ortalama pik yükseklikleri	55
<b>Tablo 9.</b> % 0,4 PPy içeren % 8'lik PAN çözeltisi ile yapılan elektrode edilmiş nanolif modifiyeli elektrot üretimi sonrası analitlerin DPV ölçümlerinden elde edilen ortalama pik yükseklikleri	55
<b>Tablo 10.</b> % 0,8 PPy içeren % 8'lik PAN çözeltisi ile yapılan elektrode edilmiş nanolif modifiyeli elektrot üretimi sonrası analitlerin DPV ölçümlerinden elde edilen ortalama pik yükseklikleri	56
<b>Tablo 11.</b> Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ksantin, hipoksantin ve ürik asit ile girişim potansiyeli olan dopamin ve L-aspartik asit çözeltilerinden alınan DPV ölçüm sonuçları ve pik potansiyelleri	59
<b>Tablo 12.</b> Farklı konsantrasyonlarda ksantin oksidaz enzimi ile muamele edilen hipoksantin çözeltisinin DPV ölçüm sonuçları	62
<b>Tablo 13.</b> 1,1 U'luk XOD enzimi ile farklı sürelerde muamele edilen Hx çözeltisinin DPV ölçüm sonuçları	64
<b>Tablo 14.</b> Analitlerin farklı konsantrasyonlardaki (1, 2, 5 ve 10 µM) karışım çözeltilerinin DPV ölçüm sonuçları ve standart sapmaları	66
<b>Tablo 15.</b> Hx, Xn ve UA için LOD ve LOQ değerleri (µM)	67
<b>Tablo 16.</b> Farklı koşullarda saklanan 30 günlük elektrotlar ile taze elektrotların hipoksantin, ksantin ve ürik asit (10 µM) ölçüm performansları	70
<b>Tablo 17.</b> 30 günlük depolama boyunca 4°C'de ve 25°C'de muhafaza edilen nanomodifiye elektrotlar ile alınan DPV ölçümlerinde % sapma oranı	71
<b>Tablo 18.</b> Gerçek örnekte elektrokimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları ve standart sapmaları	72

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	III
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
İÇİNDEKİLER	XI
GİRİŞ	1

## BİRİNCİ BÖLÜM LİTERATÜR ÖZETİ

1.1. Balıkta Tazelik	4
1.2. Biyosensörler: Tanımı, Tarihçesi ve Genel Özellikleri	9
1.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler	11
1.2.1.1. Voltmetrik Biyosensörler	13
1.3. Nanomateryallerin Tanımı ve Genel Özellikleri	15
1.3.1. Nanomateryallerin Sınıflandırılması	16
1.3.2. Poliakrilonitril (PAN) Nanolifler	21
1.4. Elektrodeğirme Teknolojisi ve Temel Prensipleri	22
1.5. Hipoksantin, Ksantin ve Ürik Asit Belirlenmesine Yönelik Biyosensör Çalışmaları	26

## İKİNCİ BÖLÜM MATERYAL-YÖNTEM

2.1. Materyal	31
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	31
2.1.2. Balık Numunesi	32
2.2. Yöntem	33
2.2.1. Elektrodeğirilmiş PAN Nanolifler ile Elektrot Modifikasyonu	33
2.2.2. Üçlü Elektrot Sistemi	34
2.2.3. Optimizasyon Çalışmaları	35
2.2.3.1. Yalın PGE (Kaplanmamış Elektrot) ile Analitlerin Elektrokimyasal Karakterizasyonu	35

2.2.3.2. PAN Nanomodifiye PGE Yüzeyleri ile Analitlerin Elektrokimyasal Karakterizasyonu	35
2.2.3.3. PAN Nanomodifiyeli PGE Yüzeyleri ile Seçicilik Çalışması	36
2.2.3.4. Kontrollü Bozunma Koşullarında Elektrokimyasal Ölçümler	36
2.2.3.5. Tespit Limiti (LOD) ve Miktersal Tayin Limiti (LOQ) Belirlenmesi	37
2.2.3.6. Elektrot Depolama ve Ölçümlerde Sapma Oranı	37
2.2.3.7. Gerçek Örneklerde Nanobiyosensörün Uygulanması	37
2.2.3.7.1. Mikrobiyolojik Analizler	38
2.2.3.7.2. pH Ölçümleri	38
2.2.3.7.3. Elektrokimyasal (DPV) Ölçümler	38

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Elektroeğirme Gerçekleştirilerek PAN Nanolifler ile Kaplanmış Sensör Yüzeylerinin Karakterizasyonu	39
3.2. Modifiye Edilmemiş Kalem Ucu Elektrot (PGE) Sensör Yüzeyleri ile Analitlerin Elektrokimyasal Karakterizasyon Çalışması	46
3.3. Elektroeğrilmiş PAN Nanomodifikasyonu Uygulanan PGE Sensör Yüzeylerinin Elektrokimyasal Performansının Değerlendirilmesi	55
3.4. PAN Nanomodifikasyonu Uygulanan PGE Yüzeylerin Seçiciliği	58
3.5. Kontrollü Bozunma	61
3.5.1. Farklı Konsantrasyonlarda Enzim (XOD) Uygulamasıyla Kontrollü Bozunma	61
3.5.2. Farklı Süre Enzim (XOD) Uygulamasıyla Kontrollü Bozunma	63
3.6. Tamponda Tespit Limiti (LOD) ve Miktersal Tayin Limiti (LOQ)	65
3.7. Elektrot Depolama ve Ölçümlerde Sapma Oranı	69

**DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**

**SONUÇ VE ÖNERİLER**

**74**

**KAYNAKLAR**

**76**



## GİRİŞ

Balık, yüksek oranda protein, yağ asitleri, vitamin ve mineraller içeren besin değeri yüksek bir gıda maddesi olup bozulmaya da oldukça açıktır. Balığın yakalanmasından itibaren ortam koşullarına bağlı olarak başlayan kimyasal reaksiyonlar ve açığa çıkan çeşitli maddeler, depolama süresince kalite kaybı ve bozulma reaksiyonlarının seyrini göstermektedir. Tazelik, balık piyasasında en önemli parametrelerden biri olup balığın tazeliği veya bozulma durumu, enzimatik otoliz, lipid oksidasyonu ve hidroliz, enzimatik olmayan oksidasyon, mikrobiyal aktivite, uçucu madde oluşumu ve diğer biyojen aminlerin açığa çıkmasına bağlı mekanizmalar doğrultusunda şekillenmektedir (Prabhakar ve ark., 2020).

Balık etinin tazeliğine ilişkin olarak yapılabilecek test ve analizlerin gerçekleştirilmesi, zaman alan bir örnek hazırlama sürecine ilaveten pahalı malzemelerin kullanıldığı ve eğitilmiş iş gücü gerektiren bir süreç olmakla beraber, kullanılan tekniklerin seçicilik ve hassasiyeti beklentilerin altında kalabilmektedir (Dervisevic ve ark., 2015). Geleneksel yöntemlerin dezavantajlarına karşılık, özellikle de elektrokimya, optik ve matematik başta olmak üzere çeşitli çalışma alanlarında kaydedilen hızlı gelişmelere paralel olarak balıkta tazeliğin belirlenmesine yönelik hızlı, kolay ve ekonomik teknikler geliştirilmekte, biyosensör teknolojisi de bunların içerisinde yer almaktadır (Wu ve ark., 2019). Biyosensör, belirtildiği gibi hızlı, üretimi kolay ve maliyetten tasarruf edilebilecek olan ve son zamanlarda balığın tazeliğini belirlemeye yönelik olarak önde gelen yeni teknolojiler içerisinde gösterilen bir analiz aracıdır. Biyosensörlerin temel bileşenleri, hedef maddeyi (analiz edilecek maddeyi) algılayan biyolojik molekül ve bu biyolojik molekül ile analit arasındaki etkileşimi elektriksel, termal veya optik sinyallere çeviren bir dönüştürücüdür (Thakur ve Ragavan, 2013). Dolayısıyla biyosensör tasarımı, analiz edilmesi planlanan madde ve çalışma ortamı (çalışılacak gıda örneği) başta olmak üzere analiz hedefleri doğrultusunda pek çok yenilik ve gelişmelere açık bir çalışma alanıdır. Örneğin, elektrot üretimlerinde yararlanılan teknikler ile de sayısız tasarım çeşitliliği sağlanabilmektedir. Bu yardımcı tekniklerden biri olan elektroçirme, ultra hassas algılama sistemlerinin üretiminde öne çıkan nanoteknoloji bazlı bir yaklaşım olup, bir polimer çözeltinin, bir enjeksiyon sisteminden püskürtülmesi itibarıyla maruz kaldığı yüksek voltajlı elektrik alan etkisinde çok küçük boyutlarda lif (fiber) yapıları oluşturmasına dayalı bir uygulama olarak ifade edilebilir. Elde edilen nanofiberlerin

yüksek porluluk (gözeneklilik) ve yüzey alanına sahip olması, biyosensör teknolojisi bakımından son derece önemli olan etkileşim alanını temas noktaları boyunca homojen bir şekilde artırma avantajını sağlamasının yanında nanofiber yüzeyinin grafen, karbon nanotüpler, nanopartiküller gibi çeşitli nanomateryaller ile fonksiyonelleştirilmek suretiyle amaca göre özellikleri geliştirilmiş nanoyapılar halinde kullanımını da mümkün kılmaktadır. Yöntemin sağladığı kilit avantaj, liflerdeki por (gözenek) yapısının artırılmasıyla, yüzeyden elektroğirilmiş nanolif kaplı elektrotlara gerçekleşecek analit çözeltisine karşı oluşan kütle transfer direncinin düşmesi olarak açıklanabilir (Mercante ve ark., 2017). Böylelikle elektroğirme tekniği, yeni biyosensör elektrotları veya reaksiyon ara yüzü oluşturmada bir yenilik ve tasarıma yardımcı bir teknoloji olarak karşımıza çıkmakta, bu teknik ile üretilen nanoyapılar “elektrospun” olarak adlandırılmaktadır.

Biyosensör teknolojisinin sahip olduğu bu önemli potansiyelden hareketle, kaydedilen her yeni gelişmenin, gıda güvenilirliğinin sağlanması ve izlenmesindeki etkinliği artırarak tüketici sağlığının korunması başta olmak üzere çeşitli ekonomik önlemler ve/veya aksiyonların planlanması bakımından zaman, maliyet ve emekten kazanım sağlayacağı düşünülmektedir. Zira insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan ve gıda güvenilirliği açısından büyük önem taşıyan balığın tazeliğinin belirlenmesinde bir kriter olan ksantin (Xn), hipoksantin (Hx) ve ürik asidin (UA) tespitinde, mevcut yöntemlere ait dezavantajların giderildiği daha üstün bir analiz tekniğinin geliştirilmesine duyulan ihtiyacın karşılanması amaçlanmış, diğer yandan da hassasiyet başta olmak üzere performans kriterlerinde iyileşme sağlanması hedeflenmiştir. Dolayısıyla bu çalışma ile gerçekleştirilen biyosensör tasarımı, balık gibi temel bir gıdanın tazeliğini belirlemeye yönelik olarak nanoteknoloji destekli ekonomik, hassas ve pratik bir analiz yöntemi ve malzemesi üretmek hedefiyle planlanmıştır. Bu noktada, nanomodifiye reaksiyon yüzeyi kazandırılan PGE elektrot üretiminin elektroğirme tekniğinden yararlanılarak gerçekleştirilmesi, tasarımın temelini oluşturmaktadır. Böylelikle hedef maddeler (analitler) ile temas yüzeyi alanının artırılması ve daha iyi bir etkileşimin sağlanması mümkün hale getirilmiştir. Bu doğrultuda biyosensör tasarımında düşük maliyetli ve bol bulunan malzemelerin kullanımı esas alınmak suretiyle kalem ucu (PGE) elektrotlar üzerine poliakrilonitril (PAN) polimerinin elektroğirilmesine dayalı bir elektrokimyasal sensör tasarımı yapılmıştır. Böylece elektrokatalitik özelliği, adsorpsiyon kapasitesi ve analit

etkileşimi iyileştirilmiş, geniş reaksiyon yüzeyi sağlanmış nanomodifiye elektrot yüzeylerinin elde edilmesi amaçlanmıştır.



## BİRİNCİ BÖLÜM LİTERATÜR ÖZETİ

### 1.1. Balıkta Tazelik

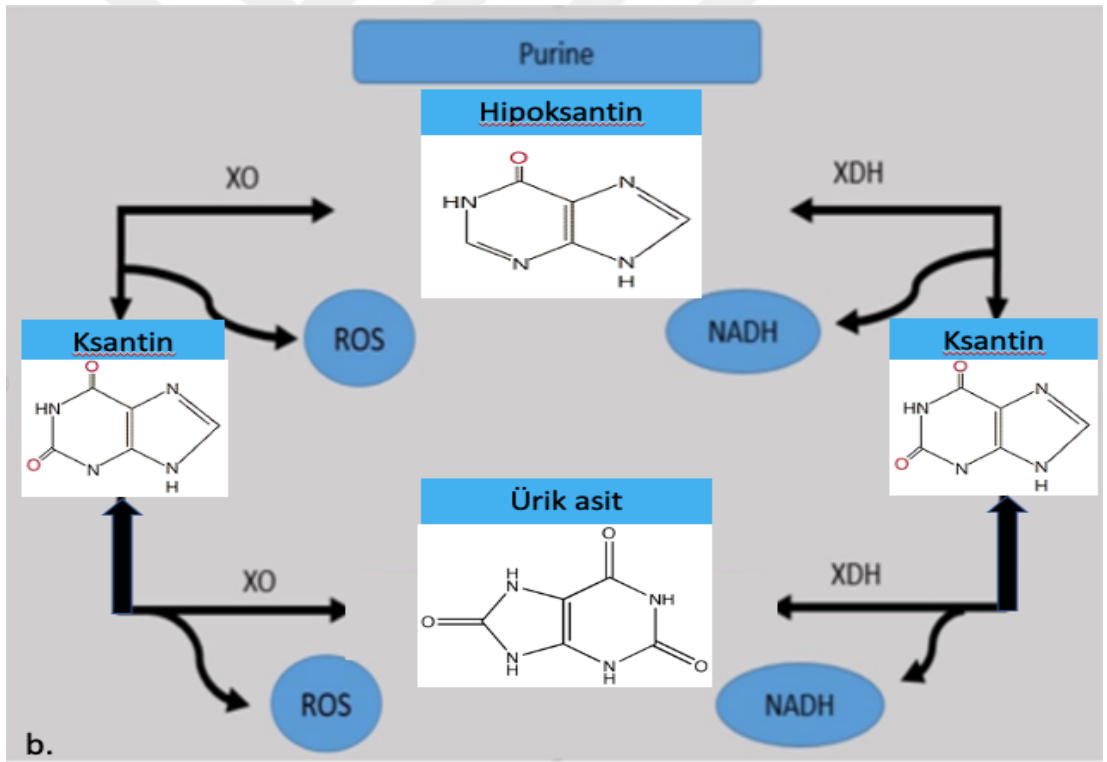
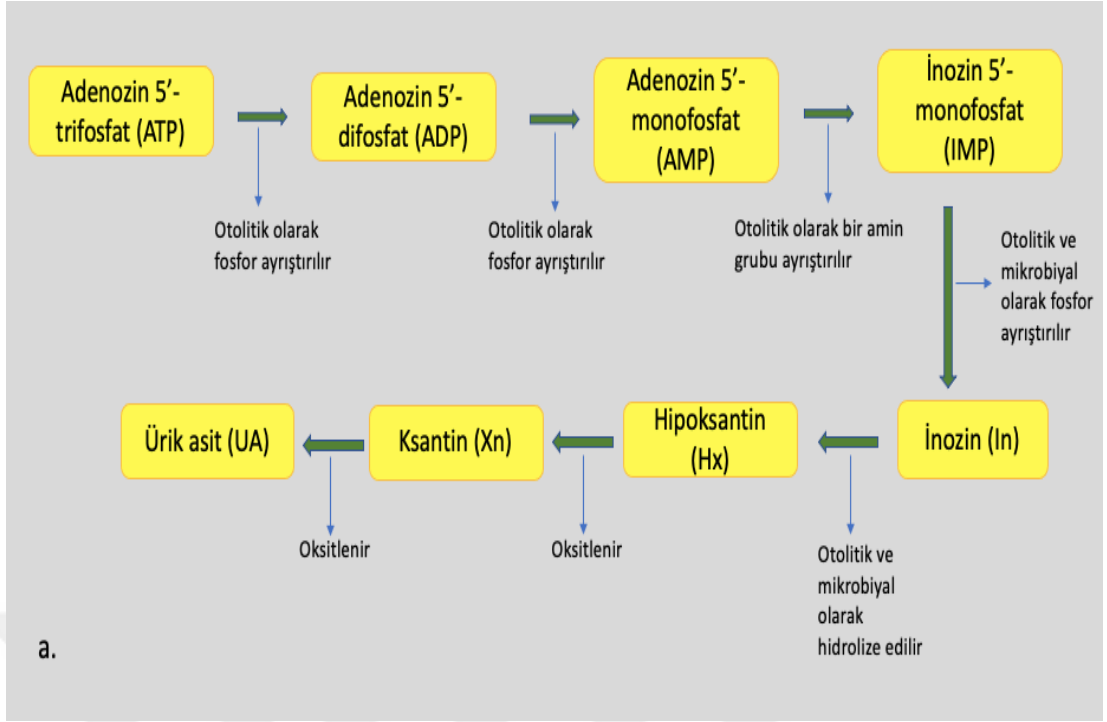
Balık, yüksek oranda protein, çeşitli yağ asitleri, vitaminler ve mineralleri içeren besleyici bir gıda maddesi olmakla birlikte bozulmaya karşı da oldukça hassastır (Wu ve ark., 2019). Diğer et türleri ile karşılaştırıldığında, balığın bol miktarda içerdiği endojen enzimler ve soğuk depolama koşullarında da gelişip çoğalabilen psikrofilik mikroorganizmalar bu durumun temel etkenleridir. Kalite bozulmaları dokuda yumuşama, deride renk değişimleri, kötü koku ve/veya kas dokusundan belirgin bir sıvı sızıntısı (su salma) biçiminde kendini gösterebilmektedir. Ayrıca, balığın gevşek bağ dokusu, etin birçok küçük kas grubuna ayrılmasına ve bakterilerin bu kas gruplarını daha kolay istila ederek bozmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, uygun olmayan işleme, nakil veya depolama koşulları altında balığın fizikokimyasal özelliklerinin değişmesi ve bozulma eğilimindeki artış göz ardı edilemeyecek boyuttadır (Sequeira-Munoz ve ark., 1999; Wu ve ark., 2019). Dolayısıyla balığın bozulma nedenleri kısaca enzimatik ve mikrobiyal faktörlere dayandırılmakta iken, bu çerçevede meydana gelen değişimler enzimatik otoliz, lipid oksidasyonu ve hidrolizi, enzimatik olmayan oksidasyon, mikrobiyal aktivite, uçucu maddelerin oluşumu gibi çeşitli mekanizmalarla şekillenmektedir. Başka bir deyişle, balığın avlanması itibarıyla ortam koşullarına bağlı olarak meydana gelen söz konusu kimyasal reaksiyonlar ve açığa çıkan çeşitli maddeler, depolama boyunca tazelik ve kalite kaybına neden olmaktadır (Prabhakar ve ark., 2020). Tüm bunlar, balık eti kalitesini aynı zamanda değişken ve varyasyonlara açık kılmaktadır. Nitekim, göl balıklarında et kalitesi üzerine yapılan bir çalışmada, bir gölün farklı bölümlerinden tutulan balık örnekleri arasında dahi kalite farklılıkları olduğu ortaya çıkmıştır (X, 2019). Şu halde, balık etinin kalitesini etkileyen faktörler tür, genotip, beslenme ve çevresel faktörler, hasat koşulları ve ölüm sonrası işleme koşulları şeklinde sıralanırken (Listrat ve ark., 2016), kalitenin çok değişkenli ve sabit olmayan unsurlara bağlı olduğunu göstermekte, bu amaca yönelik izleme ve kontrollerin kolaylaşması gerekliliği bir kez daha ortaya çıkmaktadır.

Öte yandan, sağlıklı beslenme anlayışı ile birlikte taze ve kaliteli gıdaya olan talep giderek artmaktadır. Gıdaların tazeliğini ve kalitesini kaybetmeye başlaması, tüketici güvenini ve memnuniyetini zedelemekle kalmayıp, ürünün risk durumuna

göre tüketicinin sağlığını da tehlikeye atmaktadır. Besleyici ve ekonomik açıdan değerli gıdaların tazeliğinin belirlenmesinde zamana karşı bir yarış söz konusudur (Özkaya ve ark., 2021). Başka bir deyişle, değişikliklerin duyu organlarımızla algılanabilir hale gelmeden önce tespit edilmesi, olası ekonomik kayıpların öngörülmesi/önlenmesi kadar tüketicinin korunması için de önem arz etmektedir. Çünkü, balığın tüketim zamanındaki tazeliğin belirlenememesine ek olarak durumun küresel düzeydeki gıda israfı boyutu halen güncelliğini korumaktadır (Guo ve ark., 2021). Nitekim FAO, yılda 179 milyon ton balık üretilmesine rağmen sadece 156 milyon ton balığın tüketilebildiğini bildirmiş ve oluşan israfa dikkat çekmiştir (Saeed ve ark., 2022). Bu nedenle, gıda endüstrisinde balık ürünlerinin tazelik durumunun değerlendirilmesi mutlak bir gerekliliktir (Pundir ve ark., 2011). Bu noktada, bozulma mekanizması ve ilgili indikatörlerin bilinmesi, kritik öneme sahiptir. Balığın tazeliğini yitirdiği süreçte açığa çıkan çeşitli metabolitler ve bazı değişimler, “tazelik indikatörü” olarak ifade edilmekte ve genellikle bu indikatörlerden biri veya birkaçı, tazelik durumunun göstergesi olarak analiz edilmektedir.

Genellikle glikoz, laktik asit, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, uçucu azotlu bileşikler ve biyojenik aminler gibi maddeler et ve balıkların depolanması sırasında tazeliğin kaybıyla birlikte açığa çıkmaktadır (Park ve ark., 2015). Öte yandan, amino asitler genellikle ölüm sonrası süreç ilerledikçe proteinlerin otolizi ile açığa çıkmakta, balık ve çeşitli et türlerinde mikroorganizmaların gelişip çoğalmasını teşvik etmektedir. Bu post-mortem dönemde gerçekleşen otolitik ve mikrobiyal reaksiyonlar sonucu amonyak, aminler, uçucu bazik azot (TVB-N), trimetil amin (TMA), merkaptan, indol, tirozin kompleksleri, hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) gibi reaksiyon ürünleri açığa çıkmakta ve genellikle bozulmanın kimyasal göstergeleri olarak kabul edilmektedir (Fu ve ark., 2019). Söz konusu metabolitler içerisinde biyojenik aminler, serbest amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilaz aktiviteleri ile oluşurken (Jairath ve ark., 2015), proteinlerin mikrobiyal metabolizması sonucu açığa çıkan dimetil amin ve trimetil amin gibi maddeler, uçucu azotlu bileşikler (TVB-N) ortak adı altında incelenmektedir (Park ve ark., 2015). Bu metabolitler, kromatografik yöntemler (Kumudavally ve ark., 2001), titrimetrik analiz (Quiao ve ark., 2017), spektrofotometrik yöntemler (Albeda ve ark., 2017), anyon değişim kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, çökeltme ve kapiler elektroforez (Nakatani ve ark., 2005) ve hatta pH ölçümleri (Kuswandi ve Nurfawaidi, 2017) gibi çeşitli tespit yöntemleriyle analiz edilebilir. Hatta, duyuusal değerlendirme de balık etinde tat ve

lezzeti değerlendirmede güvenilir bir yöntem olmaya devam etmektedir (Mahboob ve ark., 2018). Bunlar klasik yöntemler olarak bilinmekte, sağlam ve hassas olmaları nedeniyle hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Wu ve ark., 2019). Örneğin, Qiao ve ark. (2017) tarafından tavuk etinde titrimetrik metod ile TVB-N oluşunu analiz edilmiştir. Kromatografik yöntemlere bakıldığında, yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak şenman (2007) tarafından gökkuşağı alabalığında biyojen amin ve Saraç (2011) tarafından Atatürk Baraj Gölü'nden avlanan *Carasobarbus luteus* ve *Capoeta trutta*' da hipoksantin tayini gerçekleştirilmiştir. Wojnowski ve ark. (2019) ise örneklerin hızlıca zenginleştirilmesini sağlama amaçlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntem desteği ile kanatlı etleri, domuz eti ve biftek gibi çeşitli et örneklerinde (in situ) biyojen amin tespitini GC-MS ile yapmıştır. Son yıllarda daha da gelişen teknolojiye paralel olarak yöntem çeşitliliği artmakta iken hangi indikatörün seçilip inceleneceği de bir başka önemli konudur. Nitekim, TVB-N ve pH'nın bazen yanıltıcı olabileği ve tazeliğin tespiti için daha güvenilir indikatör metabolitler ile yola çıkılması gerekliliği vurgulanmaktadır. Örneğin, soğukta depolanan alabalık burgerleri ile yapılan bir çalışmada örneklerin 28 gün boyunca duyuusal analiz skorları ve hipoksantin değerleri kaydedilmiş ve burgerlerin 21. günün sonrasında bozulduğu belirlenmiştir. Toplam uçucu bazik azot (TVB-N) değerleri, burgerler bozulduğunda dahi çok düşük bulunmuş, pH değerleri ise depolama süresince düşüş göstermiştir. Dolayısıyla, TVB-N ve pH analizleri, ürün kalitesinin tespiti için uygun bulunmamıştır. Halbuki, depolama süresince duyuusal analiz skorları ve hipoksantin değerleri arasında negatif bir korelasyon görülmüş ve hipoksantin analizi, balık burgerlerinin kalitelerinin belirlenmesi için uygun bir parametre olarak önerilmiştir (Metin, 2002). Ksantin, hipoksantin ve ürik asit ile beraber ATP bozunma ürünlerindedir. ATP yıkımına ilişkin reaksiyon basamakları, şekil 1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1a. ATP yıkım reaksiyon zinciri (Hernandez-Cazares ve ark., 2010) b. Ksantin oksidoredüktazlar ile gerçekleşen metabolik yol izi (NADH: nikotin amin adenin dinükleotit, XO: ksantin oksidaz, XDH: ksantin dehidrogenaz, ROS: aktif oksijen) (Waheed ve ark., 2021)

Şekil 1’de görülen ve ATP yıkımının gerçekleştiği reaksiyon zincirindeki son ürünler olarak Ksantin, hipoksantin ve ürik asitten oluşan bu spesifik metabolitler, ölüm zamanının bir işareti olarak adli vakalar için de önem arz etmekte ve ölçümlenmektedir (Liao ve ark., 2020). Dolayısıyla balığın ölümü itibariyle moleküler oksijen ile ksantin oksidaz katalizörlüğündeki oksidasyon reaksiyonu sonucu kaslardaki ATP ayrışmaya başlamakta ve sırası ile ADP, AMP, IMP, inozin, hipoksantin, ksantin ürik asit ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşmaktadır. IMP, taze balığın hoş lezzetine katkıda bulunan başlıca maddelerden biri iken onun bozunma ürünü olan Hx, acımsı kötü bir tat vermektedir. Dolayısıyla hipoksantin miktarının belirlenmesinin, balığın tazelik durumunda önemli bir gösterge konumunda olduğu açığa çıkmakta (Hu ve ark., 2000; Nakatani ve ark., 2005; Hernández-Cázares ve ark., 2010; Saraç, 2011) fakat bozulmayı gösteren belirli bir kritik (hipo)ksantin seviyesinin bulunmaması da göze çarpmaktadır. Nitekim Garg ve ark. (2022), muhafaza koşullarına ve türe bağlı olarak kritik (hipo)ksantin seviyelerini içeren bir veri tabanına gereksinim olduğunu belirtmektedir. Dolayısıyla mevcut biyosensör çalışmalarının hedefinde ve herhangi bir balık türü için literatürde belirli bir (hipo)ksantin tespit eşiği önerilmemekte ve mümkün olabilen en düşük LOD değerine ulaşılmaya çalışılmaktadır. Başka bir deyişle, ölçüm performansının olabildiğince artırılması hedeflenmektedir. Yine de, *Clenopharyngodon idellus*, *Hypophthalmichthys molitrix* ve *Mylopharyngodon piceus* türleri için tazelik eşik değerinin deneysel olarak belirlendiği (Qiong, Tuzhi ve Liju, 1998) ve kritik Hx/Xn seviyelerinin (11, 8 mg/100 g Hx varlığı, bozulma göstergesi) açıklandığı çalışmalar fikir sağlamaktadır. Bu çalışmalara bir başka örnek olarak Özoğul ve Balıkcı (2007), 15 gün boyunca modifiye atmosferde paketlenen sardalyaların hipoksantin konsantrasyonunun en fazla 0.79 µmol/g, vakum paketlenme ile depolanan sardalyaların ise en fazla 0.75 µmol/g’a ulaştığını bildirmiştir. Buna karşın, bozulma eşik değerlerine yönelik kapsamlı bir veri tabanı ihtiyacı halen mevcut olup özellikle yerel balık türleri için ilgili metabolitlerin kritik konsantrasyonlarını bilmenin ve ölçmenin, israfla başa çıkmaya katkıda bulunacağı belirtilerek tedarik zinciri içinde daha iyi bir kontrol mekanizması sağlama gerekliliği vurgulanmaktadır (Garg ve ark., 2022).

## 1.2.Biyosensörler: Tanımı, Tarihçesi ve Genel Özellikleri

Gelişen teknoloji, artan tüketici farkındalığı ve taleplerine paralel olarak taze ve kaliteli gıda tedarik zincirinin hammaddeden son ürüne kadarki tüm süreçlerinde zamanla yarış halinde olunması, gerekli takip ve kontrollerin de mümkün olduğunca hızlı, pratik, güvenilir ve ekonomik yollarla gerçekleştirilmesi, büyük önem arz eden bir başka konudur. Balık gibi çabuk bozulan gıdalar bu açıdan ele alındığında, analiz edilecek tazelik indikatörünün seçimi ve seçilen indikatörün tespit yöntemine ilişkin kombinasyonların çeşitliliği, pek çok neden ve ihtiyacın bir sonucu olarak görülebilir. Özellikle de literatürde yeni ve alternatif yaklaşımlara yönelik çalışmalarındaki artış dikkat çekmektedir. Zira klasik yöntemler sağlam ve yaygın olsa da, bu yöntemlerin zaman alıcı olması, çok fazla iş gücü, kalifiye personel ve pahalı ekipman/kimyasal gereksinimleri (Yazdanparast ve ark., 2019), kapsamlı numune hazırlama ve analiz prosedürleri (Wojnowski ve ark., 2017) ile çok düşük konsantrasyonlarda hata payının artması (Chauhan ve ark., 2016) gibi bazı önemli dezavantajları da bulunmaktadır. Benzer problemlerin gıda dışı alanlarda da yeniliklere ihtiyaç oluşturduğu ve/veya biyosensörün doğuşunu tetiklediği düşünülebilir.

Biyosensörün geçmişi, 1950'li yıllarda L. C. Clark'ın kandaki oksijen miktarını bir elektrot vasıtasıyla ölçmesine dayanmaktadır. 1962 yılında ise Clark ve Lyons, oksijen elektrodu ile glukoz oksidaz enzimini birleştirerek kandaki glukoz miktarını ölçmüş ve bu prensipten yola çıkarak spesifik ve duyarlı yeni bir cihaz geliştirmiştir. Bu ilk biyosensörde elektron alıcısı oksijen iken sonraki tasarımlarda enzimin redoks merkezinden elektron yüzeyine elektron taşıyabilen redoks medyatörü kullanılmaya başlanmıştır. Sonuçta, analiti algılayan biyomolekül ve analitin tepkimesi sonucu oluşan ürün sensör yüzeyine taşınmakta ve sensör yüzeyinde gaz moleküllerinin ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$  vb.) serbest bırakılması veya kullanılması, seçici iyonların oluşumu ( $H^+$ ,  $NH_4^+$ , diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar), ısı oluşumu veya azalması, optik yoğunlukta değişim, elektronun serbest hale geçmesi veya kullanılması gibi değişiklikler tespit edilerek elektrik devreleri ile ölçülebilen bir büyüklüğe dönüştürülmekte ve bu sinyal, analit derişimiyle orantılı olmaktadır (Keskin ve Arslan, 2020). Buradan hareketle biyosensörler, biyolojik moleküller veya sistemlerin seçicilik özellikleri ve ileri elektronik işlem yeteneklerinin birleştirilmesi sonucu geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanmakta (Deligöz ve Bilge, 2017; Tüylek, 2017) ve hedef maddelerin tespit edilmesini sağlayacak olan biyolojik

reaksiyonların, analit konsantrasyonu ile orantılı olarak oluşan ölçülebilir sinyallere dönüştürüldüğü yenilikçi bir tasarım olarak ifade edilmektedir (Bhalla ve ark., 2016; Mondal ve Sharma, 2016; Asal ve ark., 2018). Dolayısıyla bu küçük analizörler, hedef analit ile reaksiyona girmek ve elde edilen biyokimyasal yanıtı ölçülebilir fiziksel sinyallere dönüştürmek üzere (Asal ve ark., 2018; Kıvrak ve ark., 2019; Özkaya ve ark., 2021; Turgut, 2023) bir biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücünün (sinyal dönüştürücü) birleştirilmesi ile üretilmekte olup (Thakur ve Ragavan, 2013) hızlı cevap süresi, yüksek duyarlılık ve kullanım kolaylığı ile analiz maliyetini düşürme gibi avantajları beraberinde getirmektedir. Biyosensörler gıda teknolojisi, biyoteknoloji, genetik mühendisliği, nanoteknoloji, tıbbi tanı (kanser, MS, vb.), enzim ve antikor çalışmaları gibi pek çok farklı amaca yönelik test ve kontrollerde kullanım alanı bulmaktadır (Keskin ve Arslan, 2020). Kısacası sağlık, çevre, tarım ve gıda araştırmaları / analizlerinde biyosensörler göz ardı edilmeyecek bir konuma sahip olmuştur (Supraja ve ark., 2020; Liao ve ark., 2020; Liu ve ark., 2022). Ayrıca, yapılan çalışmalar incelendiğinde biyosensörlerin sadece akademik alanda değil, endüstride de ilgi çekici bulunduğu ve çeşitli disiplinlerden araştırmacıların ortak çalışmalar yapmasıyla daha da geliştiği ortaya çıkmaktadır. Bunun basit bir örneği olarak gebelik testi biyosensörü, biyologlar ile mühendislerin işbirliği sonucunda geliştirilmiş ve sağlık sektöründe yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Bhalla ve ark., 2016).

Gıdalarda tazeliği belirlemeye yönelik yeni yaklaşımlar ise renk indikatörleri (Ezati ve ark., 2020), elektronik burun (Rajamaki ve ark., 2004), torimetre (Sujiwo ve ark., 2018), NIR-MIR (near- middle infrared teknolojisi; Sinelli ve ark., 2010) olarak sıralanmakta iken biyosensör teknolojisi, sensörler ve yenilebilir sensörleri de kapsamakta (Zhai ve ark., 2020a) ve hatta daha da geliştirilerek örnek başında analiz (Point of Care: POC) ve cep telefonlarına adapte edilerek gerçek zamanlı izleme sağlamakta, buna yönelik portatif ve ekonomik tasarım çeşitliliğiyle son zamanlarda öne çıkmaktadır (Zhang ve ark., 2021; Chaithra ve ark., 2023; Villarino ve ark., 2023; Yumnam ve ark., 2023).

Biyosensör teknolojisindeki tasarım çeşitliliği, biyosensörün yapısal birimlerinin de farklılık göstermesine dayanmaktadır. Örneğin, biyosensörlerin biyolojik işlevini yerine getirecek olan biyolojik tanıyıcının bir enzim, aptamer, canlı bir hücre, DNA parçası veya bir antikor olabilmesi dahi çeşitliliğin boyutunu ortaya koymakta ve bunların her biri, biyosensörlerin sınıflandırılmasında

biyoreseptör temelinde bir alt kategori oluştururken, dönüştürücü tipi elektrokimyasal, optik, termal (kalorimetrik) ve piezoelektrik (kütle tabanlı) olabilmektedir (Kara ve ark., 2004; Kara ve ark., 2010; Bulut, 2011; Kant ve ark., 2018; Özer ve ark., 2022). Dolayısıyla biyosensörler, ana bileşenlerindeki (biyolojik algılayıcı ve sinyal dönüştürücü) çeşitliliğe istinaden sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada ise yalnızca elektrokimyasal biyosensörler ayrıntılı olarak incelenecektir.

### **1.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler**

Çevirici kısımda elektrokimyasal yöntemlerin kullanıldığı biyosensörlere “Elektrokimyasal Biyosensörler” adı verilmektedir (Aykut ve Temiz, 2006). Elektrokimyasal biyosensörler basit ve güvenilir oluşunun yanı sıra hızlı, pratik ve düşük maliyetli olmaları ile öne çıkmakta ve özellikle gıdaların kalite kontrolü, çevresel test ve izlemeler ile sağlık hizmetlerinde uygulama alanı bulmaktadır (Putzbach & Ronkainen, 2013). Bu alanlardaki yaygın biyosensör uygulamaları örneklenecek olursa alg toksinleri (Vogiazzi ve ark., 2019), bulaşıcı hastalıklar (Alafeef ve ark., 2020; Echeverri ve Orozco, 2022), kanser biyobelirteçleri (Dong ve ark., 2021), nükleik asitler ve toksinler (Campàs ve ark., 2012; Cui ve ark., 2023), mikotoksinlerin (Dong ve ark., 2021) tespitinde öne çıkmaktadır. Ticari başarıya ulaşabilmiş olan bu biyosensörler, en yaygın biyomoleküler elektronik cihazlar arasında yer almakta (Zhao ve ark., 2010) ve tasarımlarında, biyolojik bileşenlerin seçiciliği ile elektroanalitik yöntemlerin hassasiyeti birleştirilmektedir (Ronkainen ve ark., 2010). Biyosensör teknolojisine dayalı çalışmalar içerisinde elektrokimyasal temelli tasarımların daha öne çıkmasında, avantajlı malzeme/tasarım alternatifleri de etkili sayılmaktadır. Nitekim, tek kullanımlık grafit elektrotlar (kalem ucu elektrot: PGE) bunun en iyi örneği sayılabilir. PGE, diğer karbon temelli elektrotlara kıyasla daha ekonomik, yüzey parlatma gibi zaman alıcı işlemleri gerektirmeyen, yüksek algılama hassasiyetine sahip ve kullanımı kolay elektrokimyasal elektrotlardır. Tek kullanımlık olan bu elektrotların elektrokimyasal modifikasyonu, diğer modifikasyon işlemlerine göre daha basit ve az zaman alan bir stratejiye dayandığından, çeşitli voltametrik tekniklerle çok çeşitli analitlerin belirlenmesinde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Bu çalışma elektrotlarının da nanomalzemelerle modifiye edilmesi sayesinde elektroaktif yüzey alanı artırılmak suretiyle kimyasal analitin karakterize edileceği bağlanma bölgesi sayısı ve hassasiyet arttırılabilmektedir (Yaman, 2022). Bir

başka deyişle, nano-biyoteknolojiden yararlanılan tasarımlar ile elektrokimyasal biyosensörlerin analitik performansının daha da artırılmış olduğu görülmektedir (Campàs ve ark., 2012). Nitekim ette ve/veya balıkta ksantin tayinine yönelik olarak elektrokimyasal biyosensör tasarımlarının daha baskın olduğu ifade edilebilir. Bu durum, özellikle elektrokimyasal biyosensörlerin daha hassas, basit, kompleks bir örnek hazırlama süreci gerektirmeyen, hızlı ve ekonomik tayinler yapılabilmesini mümkün kıldığı, daha geniş bir konsantrasyon aralığı, düşük LOD (tespit limiti), yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlanabildiği, bu yüzden daha fazla tercih edildiği vurgulanarak açıklanmaktadır (Dervisevic ve ark., 2015, 2019). Elektrokimyasal biyosensörler, hızlı ve spesifik bir analiz sürecinin yanı sıra ucuz, taşınabilir ve minyatürize edilebilir olması gibi özellikleri ile hızlı tanıya yönelik çip tasarımlarının temelini oluşturmaktadır. Bu amaçla son yıllarda, gıda kalite ve güvenliğine yönelik hedeflenen analizlerde biyosensör teknolojilerine sıkça başvurulmaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörlerin çalışma prensibi, immobilize edilen biyomolekül ile hedef analit arasındaki kimyasal reaksiyonların, reaksiyon ortamı olan çözeltinin elektrik akımı veya potansiyeli gibi ölçülebilir elektriksel özelliklerini etkilemesine dayanmaktadır (Bahadır & Sezgintürk, 2015). Bir başka deyişle elektrokimyasal biyosensörlerin temeli, potansiyometrik, amperometrik veya voltametri gibi farklı yöntemler kullanılarak bir elektriksel özelliğin (direnc, akım, potansiyel, kapasitans, empedans) ölçülmesi üzerine kuruludur (Kıvrak, 2019). Bu kapsamda amperometrik, potansiyometrik, voltametik, kondüktometrik ve impedimetrik biyosensörleri içeren pek çok çeşide rastlanmaktadır (Silva ve ark., 2018). Amperometri, belirli bir potansiyeldeki akım gücünün ölçülmesine dayanmakta ve bu akım yoğunluğu, çalışan elektrotta oksitlenmiş veya indirgenmiş elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Başka bir deyişle, 2 elektrot arasında gerilim uygulanmasıyla elde edilen akım ölçülmekte ve işlem sonucunda elde edilen grafik, zamana karşı akımın değişimini göstermektedir (Özer, 2022). Potansiyometride, genellikle çalışma elektrodu ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkı ölçülmekte ve elektrot potansiyelinin belirlenmesi, doğrudan analit derişimini tanımlamaktadır. Hava nemi ve belirli gazların derişiminin belirlenmesinde ise kondüktometrik biyosensörler kullanılmakta olup amperometrik ve potansiyometrik biyosensörlere göre daha az uygulama alanına sahip olsalar da kondüktometrik biyosensörler analiz esnasında referans elektrot kullanılmaması, düşük voltajda çalışılması ve ışığa duyarsız olma gibi avantajlar sunmaktadır (Keskin

ve Arslan, 2020). İmpedimetrik yöntemlerde ise bir biyolojik elemanla kaplanmış olan çalışma elektrodunun analitle etkileşimi sonucu kapasitans ve elektrot-elektrolit ara yüzeylerindeki elektron transfer kinetiğinde meydana gelen değişikliğin belirlenmesi (impedans değerleriyle) esas alınmaktadır. Bu amaçla yararlanılan elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerinin, korozyon kinetiklerinin belirlenmesi, metal-elektrolit arayüzeyinde meydana gelen olayların karakterizasyonu ve miktarlarındaki değişimlerin analizini mümkün kılmaktadır (Kıvrak, 2019). Sonuç olarak transdüksiyon (sinyal dönüşüm) tekniğine ve kaydedilen sinyale göre birbirinden ayrılan tüm bu biyosensörler, yüksek özgüllük, düşük tespit limitleri ve matris girişimini nispeten elimine etme gibi avantajlar sunmaktadır (Zhang ve ark., 2018). Bu çalışmada yararlanılmış olan voltametrik biyosensörler ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

#### **1.2.1.1. Voltametrik Biyosensörler**

Voltametri, uygulanan anodik veya katodik potansiyelle ortaya çıkan akım değişimini incelemekte olup uygulanan potansiyelin, elektrot yüzeyinde elektrokimyasal indirgenme veya yükseltgenme ile elektroaktif türlerin derişiminde değişime neden olmasından yola çıkılarak bu potansiyel ile derişim arasındaki ilişkinin incelenmesi biçiminde açıklanmaktadır (Oğuz, 2018). Başka bir ifadeyle, voltametrik teknik ile analitin kimyasal özellikleri potansiyel, akım ve zamanın bir fonksiyonu olarak ölçümlenmekte ve uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı grafiği olarak elde edilen voltamogramlarda, çalışma elektrodu ve analitin elektroaktivitesine bağlı olarak meydana gelen redox (oksidasyon-redüksiyon) reaksiyonları sonucu akım pikleri kaydedilmektedir. Bu piklerin genişliği ve yüksekliği gibi nicelikler, analitin elektrokimyasal özelliklerini yansıtmakta olup, söz konusu reaksiyon çalışma elektroduna ait gerilim aralığının belirli bir noktasında gerçekleştiği için piklerin konumları da maddelerin tanınmasında önem taşımaktadır. Bu nedenle voltamogram, çözeltilerdeki elektroaktif maddelerin nitel ve nicel özelliklerini yansıtmaktadır (Çetintaş, 2013). Literatürdeki biyosensör çalışmaları incelendiğinde, voltametrik tekniklerin geniş uygulama alanına sahip olması, aşağıdaki unsurlara dayanmaktadır:

- Hem organik hem de anorganik türler için geniş bir konsantrasyon aralığında üstün duyarlık ( $10^{-12}$ - $10^{-1}$  M)
- Geniş sıcaklık aralığı
- Çeşitli analitlerin eş zamanlı tayini

- Düşük miktarlarda numune gereksinimi (Şahin, 2017).

Voltametri, spesifik analitler ile bir elektronik iletken (çalışma elektrodu) arasında değiş tokuş edilen elektronların enerjisinin ölçülmesine dayalı bir teknik olduğundan, çalışma elektrodunun doğası bu elektrokimyasal teknikte çok önemli bir rol oynamaktadır. Başta soy metaller, cıva veya karbon gibi malzemelerden oluşan çalışma elektrotları, voltametrik çalışmaların çoğu için uygun bulunmaktadır. Mikro mol düzeyinde veya daha düşük konsantrasyonlardaki analitlerin voltmetrik ölçümlerinde, üstün iletken ve kimyasal özelliklere sahip malzemelerle modifikasyonu gerçekleştirilmiş olan çalışma elektrotları kullanılmaktadır. Dolayısıyla son 20 yılda, voltametrik deneylerde kullanılan elektronik iletkenlerin yüzeylerini geliştirmek için metaller (Au, Ag, Pt gibi), metal oksitler ( $Fe_2O_3$ ,  $Al_2O_3$ ,  $CuO$ ,  $CoO$ ,  $MoO_3$ ,  $Bi_2O_3$ ) ve farklı karbon malzemelerden (çok duvarlı ve tek duvarlı karbon nanotüpler) türetilen nanopartiküller, yaygın olarak kullanılmakta ve önemli kimyasal, fizyolojik bileşenlerin tayinine yönelik voltmetrik sensörlerin tasarımında yer almaktadır (Gulaboski, 2022).

Elektrokimyasal biyosensörlerin bir türü olan voltametrik sensörler, bu gruptaki bir diğer tür olan amperometrik biyosensörler ile benzer şekilde üçlü elektrot sistemi ile çalışmaktadır. Bu sistem, analitin algılandığı çalışma elektrodu, akım kaynağı olarak karşıt elektrot ve potansiyelin uygulandığı bir referans elektrodu içermektedir. Amperometrik biyosensörlerde sabit potansiyel uygulanırken voltmetrik biyosensörlerde uygulama potansiyeli değişkendir. Sonuç itibarıyla, uygulanan potansiyel altında çalışma elektrodu yüzeyinde meydana gelen kimyasal reaksiyonlara bağlı akım sinyalleri oluşmakta ve analit tayin edilmektedir. Voltmetrik biyosensörlerde değişken potansiyel uygulaması (diferansiyel puls voltametri), döngüsel voltmetri, diferansiyel puls voltametri, kare dalga voltametri, anodik strip voltametri gibi tekniklere dayalı alt kategoriler bulunabilmektedir (Wu ve ark., 2023). Söz konusu teknikler içerisinde, bu çalışmada yararlanılmış olan diferansiyel puls voltametrisinin açıklanması yerinde olacaktır. Diferansiyel puls voltametrisinde çalışma elektroduna uygulanan gerilim, elektroaktif maddenin indirgenme veya yükseltgenme gerilimine ulaştığında, elektrot yüzeyindeki maddenin çok hızlı tüketilmesi ile akımda artışa yol açması ve bu durumda elektrot yüzeyi ile çözelti arasında oluşan derişim farkı sonucunda çözülden elektrot yüzeyine difüzyonla kütle

transferinin gerçekleşmesi fakat difüzyonla kütle aktarım hızının elektron aktarım işleminin hızı ile yarışmaması nedeniyle akımdaki üstel düşüşün pik şeklini oluşturmasına dayanmaktadır. Bu gerilim-akım cevap grafikleri de voltamogram üzerinde incelenerek yorumlanmaktadır (Ayrancı, 2013). Literatürde, balıkta tazeliğin de dahil olduğu çeşitli gıda analizleri ve diğer farklı alanlara yönelik tasarımları da kapsayan çok sayıda voltametik biyosensör örneği bulunmakta, bu biyosensörlerin oldukça hassas ve hızlı tayinleri mümkün kıldığı öne sürülmektedir (Zhang ve ark., 2019; Khan ve ark., 2020; Zhu ve ark., 2021).

### **1.3. Nanomateryallerin Tanımı ve Genel Özellikleri**

Nanomateryaller, nano ölçekli tek ya da çok boyutlu malzemeler olarak tanımlanmakta (Li ve ark., 2019) olup numune hazırlama ve konsantrasyon, biyoajanların immobilizasyonu ve sinyal geliştirme gibi çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır. Bu çok yönlü işlevsellik, nanomateryallerin benzersiz elektrokatalitik özellikleri, güçlü adsorpsiyon kapasitesi, geniş yüzey alanı ve kolay yüzey modifikasyonu sayesinde sağlanabilmekte ve kararlılık, hassasiyet ve seçicilik açısından performansı artırmaktadır (Curulli, 2020). Bunun doğal bir sonucu olarak son yıllarda analitik performansı, sağlamlığı ve mekanik kararlılığı geliştirilmiş biyosensörler üretmek için nanomateryaller büyük ilgi görmektedir (Lawal ve Adeloju, 2012). Ayrıca biyosensörlerin, kullanım alanından bağımsız olarak mümkün mertebede minyatürize edilmesi hedeflenmektedir. Çünkü biyosensör boyutunun mikro veya nano ölçeğe indirgenmesi, daha iyi bir sinyal/gürültü oranının elde edilmesini ve daha küçük hacimlerde numuneler ile çalışabilmeyi mümkün kılmakta, bu da maliyeti düşürmektedir. Nano ölçekte ise aktif alanın yüzey/hacim oranının artmasıyla, çalışma elektrodu boyutları analitinkiyile kıyaslanabilir düzeye inmektedir. Bu durum, tam da istenildiği gibi hem spesifik olmayan bağlanmanın (girişim) azalmasıyla hem de hedef moleküle bağlanma etkinliğinin artmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu bağlamda geliştirilmeye çalışılan nanosensörler, nanomateryallere olan ilgiyi ve çalışmalarını da artırmıştır (Bhalla ve ark., 2016).

Sonuç olarak, nanoteknolojik malzemeler ve yaklaşımların biyosensör teknolojisindeki yeri aşağıdaki unsurlara dayandırılmaktadır:

- Büyük boyutlu yapılar yerine nano boyutlu yapılarla çalışma imkânı,
- Nano yapıları malzemelerin sağladığı yüksek duyarlılık,

- Biyosensörlere nano yapılı elektronik parçacık entegrasyonu ile bellek ve işlem yeteneğinde artış,
- Karmaşık yapılı nano moleküllerin analizinde kolaylık ve çok çeşitli analitlerin tespiti (çeşitli kimyasal ajanlar, mikroorganizmalar, mineraller, vb.)
- Yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip liflerin kullanımı sayesinde analiz performansında artış,
- Daha az enerjiye gereksinim,
- Difüzyon probleminin giderilmesi,
- Biyosensörün daha uzun ömürlü olmasını sağlama,
- Canlı hücrelere zarar vermeksizin çalışma imkânı (Tüylek, 2017).

### **1.3.1. Nanomateryallerin Sınıflandırılması**

Nanomateryaller, oluşum temeline göre çeşitli gruplara ayrılmaktadırlar. Bu sınıflandırma metal, metal bileşiği, karbon ve nanokompozit bazlı nanomalzemeler olmak üzere dört ana grup içerirken (Liu ve ark., 2021), kategoriler karbon nanomalzemeler, metal oksit nanopartiküller, metal-organik çerçeveler (MOF'lar) ve iletken polimerler olarak da sıralanabilmektedir (Dervisevic ve ark., 2019-derleme). Bununla birlikte, Arduini ve ark. (2020), sadece iki kategori içeren daha basit bir sınıflandırma yaparak nanomateryalleri karbon bazlı (karbonlu) nanomalzemeler ve karbon içermeyen nanomalzemeler olarak ayırmıştır. Boyut bakımından ele alındığında, nanomalzemeler sıfır boyutlu (0D) nanopartiküller (NP'ler, nanodotlar), tek boyutlu (1D) nanorodlar (nanoteller ve nanotüpler içeren), iki boyutlu (2D) nanoyapraklar ve üç boyutlu (3D) metal organik çerçeveler (MOF'lar) gibi formlarda kullanılabilir (Yang ve ark., 2016). Literatürde bu nanomalzemeler ile yapılan çok sayıda araştırmaya rastlanmakta olup her birinin spesifik bir amaç ve tasarım doğrultusunda tercih edildiği anlaşılmaktadır.

Nanomateryaller, özellikle birçok yeni elektrokimyasal biyosensör uygulamasının çıkış noktası konumundadır. Biyosensör cihazlarının yapımında kullanılan nanoyapılar boyut (1 ila 100 nm), şekil (nanopartikül, nanotüp, nanorod, nanotel, nanolif, nanoplaka gibi), kimyasal yapı (karbon bazlı malzemeler, metaller, metal oksitler, polimer oksit gibi) ve fizikokimyasal özellikler (elektronik, optik,

manyetik, mekanik, termal) bakımından çeşitlilik göstermektedir. Nanomalzemeler, biyosensör yapımında efektif ve stabilize edici platformlar olma işlevinin yanı sıra küçük boyutları ve geniş yüzey alanı, yüksek reaktivite, kontrollü bir morfoloji ve yapıda olmaları, biyo-uyumlulukları ve bazı durumlarda elektrokatalitik özellikleri sayesinde, gelişen sensör teknolojisinin bir parçası haline gelmiştir. Sinyal dönüştürücünün nano ölçekte yapılandırılmasına katkı sağlamasıyla biyomolekül immobilizasyonu için mevcut toplam yüzeyin artırılması ve böylece sensör etkinliğinin artması da mümkün olmaktadır. Nanomalzemelerin sensör yapılarına dahil edilmesiyle kütle aktarımı ve etkileşimin hızlanmasına bağlı olarak sinyal üretiminin de hızlanması ve çoğalması, dolayısıyla sensörün cevap süresinin kısılması mümkün olmaktadır (Sapountzi ve ark., 2017).

Malzemenin türü baz alınacak olursa, nanomateryal çeşitleri arasında karbon bazlı olanların çeşitli avantajlar doğrultusunda rağbet gördüğü anlaşılmaktadır. Örneğin grafen, yüksek elektron transfer kabiliyeti ve spesifik yüzey alanı nedeniyle çokça tercih edilmektedir. Grafen, karbon atomlarının tuğla gibi örüldüğü görünümü andıran, saf bir karbon formu olmakla beraber bu yapı, grafene olağanüstü kimyasal ve fiziksel özellikler kazandırmaktadır. Grafenin oksitlenmiş formu olan grafen oksidin keşfi de, diğer araştırma alanlarında olduğu gibi biyosensör tasarımında da yeni ufuklar açmış durumdadır. Dolayısıyla grafen, grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) formlarında kullanılabildiği gibi, metal oksitler (ZnO nanorodlar), metalik nanoparçacıklar (Au), pirol, karbon nanotüpler vb. ile birlikte de kullanılabilmektedir (Arduini ve ark., 2020). Bu şekilde üretilen biyosensörler, eski tasarımlara kıyasla daha düşük tespit limitlerine (LOD) inilebilmesini sağlamak ve tek bir molekülün tespitine bile olanak tanımaktadır (Bhalla ve ark., 2016). Karbon bazlı nanomateryaller ayrıca, sahip olduğu güçlü katalitik etkiyle, redoks reaksiyonlarında sensörün elektrokimyasal tepki sinyalini önemli ölçüde arttırabileceği gibi eşsiz biyoyumluluğu ile biyomoleküllerin aktivitesini koruyarak numunelere zarar vermeksizin algılama işlemini gerçekleştirebilmektedir. Sensör minimum hacimde fakat geniş spesifik yüzey alanına sahip, yüksek mukavemetli ve kimyasal özellikler bakımından kararlı olabilmektedir. Elektrot yüzeyini ve enzimin aktif bölgesini bağlamak için moleküler bir tel olarak kullanılabilmek suretiyle protein ve enzimlerin bağlanması kolaylaşmakta ve elektron transfer yeteneği yüksek olmakta, bir reaksiyon ortamı sağlanmadan doğrudan elektrokimyasal tespit yapılabilmektedir. Tüm bu avantajlara karşın, yaygın olarak kullanılan karbon nanomateryallerin bazı

kusurları da mevcuttur. Örneğin karbon nanotüpler (CNT) kıvrılmaya ve/veya birbirine yapışmaya meyilli olsa da birçok bilimsel araştırma ve tasarımda kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2020). CNT, 1991 yılında keşfedilmiş ve CNT, Sp<sup>2</sup> karbon birimlerinden oluşan 1D yapıya sahip grafitik karbonun iğne benzeri tüpleri olarak tarif edilmektedir. Bu yapılar tek veya çok duvarlı/katmanlı (multi walled) formlarda olabilmekte, sahip oldukları geniş yüzey alanı, biyomoleküller de dahil olmak üzere diğer malzemelerin immobilizasyonu için CNT'leri uygun kılmaktadır. Öte yandan, bu iki nanomalzeme (CNT'ler ve GO) bir araya getirilerek mükemmel iletkenliğe ve suda çözünürlüğe sahip hibrit bir nanokompozit oluşturulmuştur (Huang ve ark., 2014). Karbon siyahı (CB: carbon black) da, analiz öncesi ön işlem gerektirmeyerek avantajlı konumda olan, düşük maliyetli bir başka nanomodifikasyon materyali olarak gösterilmektedir. Karbon bazlı nanomateryalleri, farklı formlardaki örnekleri ile (küresel, tübüler ve/veya fibriler manyetik karbon yapılar gibi) çeşitlendirmek mümkündür ancak önceden belirtildiği gibi bu nanomateryallerin çeşitli dezavantajları da göz ardı edilmemektedir. Örneğin grafen tabakaların kullanımında katmanlar arasında, karbon kuantum noktalarında ise nanoyapı özelliklerinin kaybı ile topaklanma eğilimi söz konusu olabilmektedir. Buna ek olarak, karbon nanomateryallerin sensörün çözücüsündeki dağılılabirliği elektrokimya alanındaki uygulamalarını sınırlayan önemli bir etken konumundadır. Bu nedenle maliyet, saflaştırmada karşılaşılan sorunlar ve kontrollü sentez gibi unsurlar üzerinde daha fazla çalışma yapılması gerektiği öne sürülse de (Liu ve ark., 2020), mevcut durumda karbon bazlı nanomateryallerin avantajlarının muhtemelen daha baskın olduğu anlaşılmakta ve bu malzemelerin kullanımına dayanan çok sayıda elektrokimyasal biyosensör örneği ile karşılaşılmaktadır. Liao ve ark. (2020), polidopamin (PDA) ile modifiyeli elektroğirilmiş karbon nanoliflere enzim (XOD) immobilize ederek geliştirdiği elektrokimyasal biyosensör ile insan gözünün camısı cisim tabakasında hipoksantin tayini gerçekleştirebilecek ve böylece adli vakalarda kullanılabilir bir biyosensör tasarlamıştır.

Öte yandan, karbon içermeyen nanomalzemeler soy metal bazlı (Au, Ag, Cu, Pt) nanoparçacıklar, inorganik kristaller, oksitler, yarı iletkenler vb. kaynaklı olabilmekte ve kan, idrar ve yüzey suları gibi karmaşık matrislerde bile sensör performansının artırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Arduini ve ark., 2020). Metal veya seramik nanopartikül modifiyeli nanolifler, yarı iletken ve metal

özelliklerine sahip polimer ve polimer modifiyeli nanolifler ile de alternatifler çoğalmaktadır (Liu ve ark., 2020).

İnorganik gruba giren metal veya metal oksit parçacıkların çeşitli malzemelerle nanobileşimler oluşturarak film haline getirilmesi ile elde edilen pek çok biyosensör çalışması var olmakla beraber, bunlardan bazılarında elektroğirme tekniğinden de yararlanıldığı görülmektedir. Nitekim Ostermann ve ark. (2011)'nin çalışmasında, elektroğirme tekniği ile düzgün bir nanopartikül ön oluşumu sağlanarak yüzey alanı, porluluk özelliği ve işlerliği daha gelişmiş, düzenli yapıda metal-organik nanolifler yardımıyla yüksek performanslı ölçümler yapılmıştır. Metal oksit nanoliflerin (MONF) kullanıldığı tasarımların genel avantajları incelendiğinde, bunların küçük boyutlu ve geniş bir partikül dağılımı ile aktif yüzey alanı/hacim, atomik titreşim düzeyi, elektron alıkonması, yüzey reaksiyonu, katalitik aktivite, adsorbsiyon kapasitesini artırarak performansı olumlu etkilediği ifade edilmektedir. Bir başka deyişle, yarı iletken MONF'in poröz kristal yapısı, etkileşim reaksiyonu koşulları açısından oldukça uygun bir ara yüz oluşturmaktadır (Mondal ve Sharma 2016; Mercante ve ark., 2017). Metal oksit kullanarak yapılan araştırmalara örnek olarak Lavanya ve ark. (2016), elektrokimyasal uygulamalarda metal oksit içeren nanomateriyaller kullanılmasını, kimyasal olarak yüklenme ve kompozit oluşumuna elverişli olmaları sayesinde elektrokatalitik özelliğinin gelişmiş olmasına dayandırarak Co-Ce<sub>2</sub>O modifiyeli camı karbon elektrot (GCE) ile hipoksantin, ksantin ve ürik asitin eşzamanlı olarak tayinini sağlayan ultra hassas bir elektrokimyasal sensör geliştirmiştir. Balık etinin tazeliğini belirlemek amacıyla üretilen bir başka elektrokimyasal biyosensör tasarımında (Devi ve ark., 2011), metal oksit (çinko oksit) nanoparçacıklar ile polipiroiden üretilen nanokompozit bir film kullanılmak suretiyle amperometrik ksantin tayini yapılmış ve biyosensörün performansı 0.8 µM -40 µM lineer aralık, 0.8 µM (S/E=3)'lük tespit limiti olarak kaydedilmiştir. Reza ve ark. (2014)'nin manganez oksit (Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ve kitosan nanokompozit yapısına XOD immobilizasyonu ile geliştirdiği elektrokimyasal biyosensör de, bir diğer örnek çalışmadır. Söz konusu örnekler çoğaltılabilmekle beraber, bu çalışmaların bir ortak noktasının XOD kullanımı olduğu dikkat çekmekte, balıkta tazeliğin belirlenmesine yönelik tasarımlarda yaygın bir uygulama olan enzim kullanımına karşılık biyoajan kullanılmaksızın (non-enzimatik) geliştirilen biyosensör örneklerinin de var olduğu ve başarılı sonuçlar alındığı görülmektedir. Şüphesiz, enzim kullanılmayan tasarımların ortaya çıkışı, enzim kullanımına bağlı çeşitli sorunların eliminasyonuna dayalı

olmuştur. Nitekim, enzim kullanımından kaynaklı başlıca sorunlar tekrar kullanılabilirlik, stabilite, immobilizasyon işlemine bağlı aksaklıklar, maliyetli ve karmaşık üretim aşamaları şeklinde sıralanabilir (Li ve ark., 2015; Zhu ve ark., 2019). Ayrıca biyoalgılama materyalleri genel olarak zamanla ısı, nem, pH ve diğer faktörlerden etkilendiği için kullanım ömürleri açısından da kritik bir durum söz konusudur (Tüylek, 2017). Buradan hareketle XOD kullanılmayan çalışmalar örneklenecek olursa, Tang ve ark. (2011)'nin ette ksantin tayinine yönelik olarak geliştirdiği elektroğirilmiş karbon nanoliflerle modifiyeli karbon pasta elektrot elektrot (CNF-CPE) ile çalışan 0.03–21.19  $\mu\text{M}$  ( $R = 0.9992$ ) lineer aralık ve 20 nM'lık ( $S/N = 3$ ) tespit limitine sahip enzimatik olmayan elektrokimyasal biyosensörünün klinik çalışmalar için de uygun olduğu kaydedilmiştir. Enzimatik olmayan bir başka çalışma ise ürik asit tayinine yönelik olarak geliştirilen, karbon nanotüp iyonik-sıvı macun elektrodun elektropolimerizasyon ile poli( $\beta$ -siklodekstrin) modifikasyonundan üretilen elektrokimyasal (voltametrik) biyosensör çalışması olup  $\text{LOD} = 0,3 \mu\text{M}$  ( $S/N = 3$ ) ve lineer aralık 0,6-400  $\mu\text{M}$  ile 0,4-1 mM olarak kaydedilen hassas bir tayin sağlanabilmiştir (Li ve ark., 2015). İbrahim ve Temerk (2016) ise bor (B) katkılı  $\text{CeO}_2$  nanoküpler ile modifiye edilmiş camsı karbon mikrokürecikli pasta elektrot geliştirerek elde ettiği elektrokimyasal sensör ile nano molar (nM) düzeyinde Hx ve Xn tayinlerini mümkün kılmıştır.

Bu çalışmalardan ayrıca, literatürde et, balık ve diğer deniz ürünlerinde tazeliği belirlemek amacıyla nanomateryallerle modifiye edilmiş elektrotların kullanıldığı elektrokimyasal biyosensör çalışmalarının ksantin, hipoksantin ve ürik asit dışındaki tazelik indikatörlerinin tayinini de mümkün kılarak çeşitlendiği görülmektedir. Örneğin, Ye ve ark. (2017) tarafından nanogözenekli alümina membran bazlı ve manyetik nanoparçacık destekli empedans immünosensör tasarımı, histamin tayinine yönelik olarak geliştirilmiş ve özellikle histidin aminoasidi bakımından zengin olan kırmızı etli balıklarda hassas bir tayin gerçekleştirilmesini mümkün kılmıştır. Öte yandan, tazelik indikatörlerinin niteliğine göre tasarımın formatı da çeşitlenebilmektedir. Yani uçucu aminlerin oluşumu, hidrojen sülfürün açığa çıkması veya buna bağlı pH değişimlerinden yola çıkılarak tazeliğin belirlenmesi amaçlandığında nanomateryallerin kullanım şekli de değişmektedir. Örneğin, farklı et ve et ürünleri için geliştirilen metal nanopartiküllerin çeşitli matrislere hapsedilmesiyle üretilen kolorimetrik sensörler, akıllı ambalaj teknolojisine entegre olmuştur. Tavuk etinde gerçek zamanlı bir izleme için gümüş (Ag) nanopartiküllerin

kullanıldığı gellan gam bazlı kolorimetrik hidrojen sülfür sensörü (Zhai ve ark., 2019) veya Zhai ve ark. (2020a)'ın, agar (AG), antosiyanin (AN), gellan gam (GG) ve TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinden çift katmanlı filmler halinde ürettiği sensörler, bu kapsamdaki örneklerdendir (Özkaya ve ark., 2021).

Bu çalışmada ise tazelik indikatörü olarak ksantin, hipoksantin ve ürik asit eş zamanlı tayin edilmesine yönelik sensör yüzeyi elde etmek amacıyla kalem ucu elektrotların poliakrilonitril (PAN) nanolifler ile nanomodifikasyonu gerçekleştirilmiş ve bu nedenle PAN ile ilgili daha ayrıntılı bilgi sunulmuştur.

### **1.3.2. Poliakrilonitril (PAN) Nanolifler**

Poliakrilonitril (PAN), yüksek gerilme mukavemeti, termal ve mekanik stabilitesi, çözücüler ve aşınmaya karşı direnci nedeniyle en çok kullanılan polimerlerden biridir. Bu yalıtkan nanolifleri elektrot malzemesi olarak kullanmak için gerekli iletkenliği sağlamak amacıyla tavlama işlemi ve sonrasında karbonizasyon uygulamasının yanı sıra metalik kaplamalar veya metal nanopartiküller, karbon nanoyapılar gibi iletken takviyeler kullanılabilir (Bourourou ve ark., 2015).

Bunlar arasında PAN (poliakrilonitril) elektrospun nanolifler ile ilgili çalışmalar, kompozit malzemeler ve yeşil teknolojilerden enerji depolama sistemlerine kadar geniş bir uygulama yelpazesini kapsayarak büyük bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. PAN nanolifler, biyolojik örneklerin analizine yönelik olarak üretilen elektrotların modifikasyonunda da kullanılmaktadır. Elektrot tasarımlarında, PAN'ın fonksiyonel bir polimer olarak iki farklı görevde kullanıldığı belirtilmektedir. Bunlardan biri, reaksiyon indükleyici (tetikleyici/başlatıcı) olarak kullanılması ve çok çeşitli Nanomateryallerle biyosensör yapısının oluşturulmasıdır. PAN nanoliflerin diğer işlevi ise bir reaksiyon plakası görevi görmesi, yani analite duyarlı maddelerin söz konusu nanoliflere yapışıp birikerek kimyasal modifikasyonun ardından elektrot yüzeyinde sensör özellikleri kazanmış bir kompozit film oluşturmasıdır (Liu ve ark., 2020).

Poliakrilonitril (PAN), nanomalzemeler ile yapılan çeşitli uygulamalar kapsamında sıkça çalışılmış olan çok yönlü bir polimerdir. PAN'ın, piroliz ve elektroçirime gibi işlemler yoluyla karbon bazlı nanomalzemelerin sentezinde bir öncü madde olarak kullanılabilceği ileri sürülmektedir. Örneğin, PAN nanolifleri, atık sudan bakır iyonlarının adsorbe edilmesine yönelik uygulamalarda MgO ile beraber başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Zhou ve ark., 2022). Bir başka çalışmada,

gümüş-ZnO heteronanoyapılarla işlevselleştirilmiş PAN tabanlı nanoliflerin gelişmiş antibakteriyel özellikler gösterdiği ortaya konmuştur (El-Samak ve ark., 2021). PAN, çeşitli nanokompozit malzemelerin yapımında da kullanılmıştır. Olağanüstü adsorpsiyon ve fotodegradasyon yeteneğine sahip PAN-TiO<sub>2</sub> nanomembranların sentezi, son dönemde PAN ile yapılan önemli çalışmalardandır (Noah, 2023). PAN ayrıca, nanoliflerin mekanik özelliklerini geliştirmek için karbon nanotüplerle birleştirilebilmektedir (Ebadi ve ark., 2016). PAN bazlı karbon nanoliflerin, benzersiz özellikleri nedeniyle sensör uygulamalarındaki kullanım potansiyeli de önemle vurgulanmaktadır (Homaeigohar, 2020). Enerji cihazları alanında, PAN bazlı karbon nanolifler yüksek yüzey alanları ve çeşitli alanlardaki potansiyel uygulamaları nedeniyle ilgi çekmiştir (Huang ve ark., 2019). PAN ayrıca süperkapasitörler için elektrot malzemelerinin geliştirilmesinde de kullanılmış ve enerji depolama uygulamalarındaki çok yönlülüğünü göstermiştir (Cherusseri ve ark., 2019). Genel olarak, PAN tabanlı nanomalzemeler üzerine yapılan çok çeşitli çalışmalar, PAN'ın çeşitli nanolif ve nanokompozit uygulamaları için bir öncü olarak önemini vurgulamakta ve kataliz, antibakteriyel özellikler, çevresel iyileştirme, sensör teknolojisi ve enerji depolama cihazlarındaki potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu potansiyelin ortaya çıkarılmasında ise bazı yardımcı teknolojilerden yararlanılarak daha üstün performans sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu teknolojilerden elektroçirime, ayrıntılı biçimde ele alınacak olup balığın tazelik kriterlerinden olan ksantin, hipoksantin ve ürik asidin eş zamanlı tayinine yönelik geliştirilecek olan elektrokimyasal biyosensör tasarımında performans kriterlerini (seçicilik, hassasiyet, maliyet, vb.) olumlu etkileyeceği öngörülen PAN nanoliflerin üretilmesinde kullanılacaktır.

#### **1.4. Elektroçirime Teknolojisi ve Temel Prensipleri**

Elektroçirime (EE), nanoteknoloji tabanlı bir yaklaşım olarak eriyik çirime, çözelti çirime ve emülsiyon çirime de dahil olmak üzere nano/ mikro ölçekte sürekli ve düzgün yapılı lif üretimi için kullanılabilir tüm çirime yöntemlerinin en iyisi olarak kabul edilmektedir (Aliheidari ve ark., 2019). Sensör tasarım uygulamalarında ve özellikle elektrot nanomodifikasyonu ve/veya reaksiyon arayüzü üretimi için kullanılan destekleyici bir teknik konumundadır. Elektroçirimenin prensibi, bir polimer çözeltisinin bir enjeksiyon sisteminden püskürtülerek maruz bırakıldığı

yüksek voltajlı bir elektrik alanının etkisi altında çok küçük fiber yapıların oluşmasına dayanmaktadır. Elde edilen nanoliflerin gözenekliliği ve yüzey alanı artmaktadır. Bu da, biyosensör teknolojisi açısından son derece önemli olan etkileşim alanının temas noktaları boyunca homojen bir şekilde artması anlamına gelmektedir. Ayrıca nanolif yüzeyinin grafen, karbon nanotüpler, nanoparçacıklar gibi çeşitli nanomateryallerle işlevselleştirilerek amaca göre özellikleri iyileştirilmiş nanoyapılar halinde kullanılmasına da olanak tanınmaktadır. Yöntemin en önemli avantajı, liflerdeki gelişmiş gözenek yapısı ile elektrospun (elektroçirilmiş) nanolif kaplı elektrotlara temas edecek olan analit çözeltisine karşı kütle transfer direncinin azalması olarak açıklanabilir (Mercante ve ark., 2017). Tasarıma yardımcı olan bu teknoloji ile üretilen nanoyapılar literatürde “elektrospun” olarak adlandırılmaktadır. EE ile nanolif üretimi, gözenek geometrisinin öngörülebilir, tek tip ve amaca uygun olmasını sağlamakta ve bu amaçla çeşitli malzemelerden (polimerler, inorganik nanopartiküller, C nanoyapılar) istenilen çapta ve yüksek etkileşim özelliklerine sahip nanolifler üretilebilmektedir. Genel olarak, ES nanoliflerin çapı min 10 nm'den birkaç mikrona kadar değişebilmekte ve işlem parametrelerine (polimer konsantrasyonu, uygulanan elektrik alanı ve çözelti akış hızı) bağlı olmaktadır. Son yıllarda, bu teknik kullanılarak çeşitli elektrot tasarımları gerçekleştirilmiştir (Marega ve ark., 2015; Aghaei ve ark., 2020). Hatta, elektrospun nanoliflerin dönüştürme hızının da oldukça yüksek olması, reaksiyonu çok daha hızlandırmanın yanı sıra uzun ömürlü ve kararlı olması sayesinde biyosensör tekrar kullanılabilirlik özelliği kazanmaktadır (Liu ve ark., 2020).

Elektroçirme, esasen iğneli ve iğnesiz olmak üzere iki şekilde uygulanabilen bir tekniktir. İğneli elektroçirmede, iğnenin tıkanması ve buna bağlı sorunların ortaya çıkabildiği fakat daha düşük voltajlarda gerçekleştirilebilen, daha ince, daha homojen yapıda nanolif üretimini mümkün kılmaktadır. İğnesiz elektroçirmede ise daha kalın ve homojenliği düşük nanoliflerin daha yüksek verimlilikte ve daha yüksek uygulama voltajlarında elde edildiği ifade edilmekle beraber, her iki tekniğin de farklı uygulama alanlarında yer bulduğu ifade edilmektedir (Liu ve ark., 2020). Elektroçirme ile ilgili olarak son yıllarda, özellikle işlem parametreleri, sistem parametreleri ve karakteristiklerine yönelik yayınların arttığı gözlenmekte ve buna paralel olarak nanolif üretimleri daha da iyileşmektedir. Bu da, elde edilen nanoliflerde daha iyi bir yapısal morfoloji, kontrollü ve homojen nanolif çapları ve hatasız lif yüzeyleri (boncuk oluşmaması) şeklinde yansımaktadır (Jacobs ve ark., 2010). Buradan hareketle nanolif özelliklerini etkileyen başlıca faktörler ele alınacak olursa; kullanılan çözeltinin

özellikleri, akış debisi, uygulama voltajı, sıcaklık, iğnenin boyutu ve toplayıcıya (kolektör) uzaklığı, ayrıca toplayıcının şekli, boyutu ve tipi şeklinde sıralanabilir. Söz konusu faktörlerin açıklanmasına çözeltili özellikleriyle başlamak gerekirse, bu işlemde viskoelastik bir çözeltili (polimer bazlı) kullanılmakta ve çözeltilinin özellikleri, oluşacak lif yapısı, gözenek boyutu ve şeklini etkilemektedir. Çözeltilinin viskozitesi, esnekliği ve yüzey gerilimi gibi parametreler, değişen polimer ve çözücü oranlarıyla ayarlanabilmekte, dolayısıyla konsantrasyon önemli bir parametre konumuna gelmektedir (Aliheidari ve ark., 2019). Nitekim çözeltili konsantrasyonunun artmasıyla viskozite de arttığından, çözeltilideki polimer zincirlerinin ve eğilmeye karşı gösterilen direncin artmasına bağlı olarak elektroegirme işlemi daha kalın lif oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Jacobs ve ark., 2010). Buna karşılık, viskozite düştükçe lif oluşumunda süreklilik azalmakta ve boncuklanma olasılığı artmaktadır. Kullanılan polimerin türü de başlı başına bir etken olup düşük molekül ağırlıklı polimer kullanımında, daha kısa ve boncuklanabilen lifler geniş bir alana yayılırken, yüksek molekül ağırlıklı polimer çözeltilerde bunun aksine daha dar bir alana daha kalın lifler atılmaktadır. Bu esnada sıcaklık ne kadar yüksekse, o ölçüde viskoziteyi düşürerek daha ince ve homojen yapıya lifler elde edilebilirken, sıcaklığın düşmesi iğne ucunda tıkanmaya dahi neden olabilmekte ve artan viskozite nedeniyle daha kalın lifler oluşmaktadır. Nem de oluşacak nanolifler üzerinde etkin faktörlerden biri olarak sayılmakta, nemin düşük olmasının kırık lifler ve iğne ucunda tıkanmalara neden olabileceğine, nemin yüksek olmasının ise işlem seyrinin spreylemeye dönmesi ve yaş liflerin oluşmasıyla sonuçlanacağına dikkat çekilmektedir (Aliheidari ve ark., 2019).

Sıcaklık ve nemin yanı sıra bir diğer önemli işlem parametresi de uygulama voltajıdır. Voltaja bağlı oluşan elektrik alanının etkisiyle çözeltilide indüklenen (tetiklenen) elektrostatik kuvvet, çözeltilinin yüzey gerilimi ve viskoziteye bağlı direncini kırdığı anda eğilme başlamakta artan voltaj lif kalınlığını da genellikle artırmaktadır. Şöyle ki, voltajdaki ılımlı artışlar artan gerilme etkisiyle lifleri önce inceltmekte fakat daha büyük artışların yarattığı elektrik alana bağlı olarak yüklerin birbirini kuvvetle itmesi sırasında yalnızca uzunlamasına değil, radyal bir genişleme de gerçekleşmekte ve oluşacak lifler kalınlaşmaktadır. Bir başka önemli işlem parametresi de mesafe olup, uygulama mesafesinin lif çapları üzerinde iki farklı etkisi bulunmaktadır. Birincisi, mesafe arttıkça lif çapının azalmasıdır. Mesafenin artmasıyla, mevcut elektrik alanında solventin buharlaşması ve aynı zamanda jetin esnemesi için daha fazla zaman sağlanarak daha ince liflerin oluşumu

kolaylaşmaktadır. Öte yandan mesafenin artması, elektrik alan gücünün ( $E = V/d$ ) azalması ve düşen ivmeye bağlı olarak daha büyük çaplı liflerin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu iki etki arasındaki denge, nihai lif çapını belirlemektedir. Dolayısıyla mesafedeki artış, lif çapını artıran veya azaltan yönde etki gösterebilir ya da değiştirebilir. Çözeltinin besleme hızı ise elyaf boyutunu, morfolojisini, verimliliğini ve eğirme işleminin stabilitesini belirleyen ve sıklıkla polimer çözeltisinin konsantrasyonu ile ilişkili olan elyaf oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Bir başka işlem parametresi olan çözelti akış debisi de elde edilecek nanolifler üzerinde önemli etkilere sahiptir. Düşük debi, çözücünün iyice buharlaşmasını ve eğirme esnasında yeterli esnemenin gerçekleşmesini sağlayarak daha ince ve tekdüze lif oluşumunu mümkün kılsa da, çok düşük bir debi ile Taylor konisinin oluşması da zorlaşmaktadır. Genellikle debi artırıldığında daha kalın lifler elde edilmekte ve üretim hızı artmaktadır (Liu ve ark., 2020).

Sonuç olarak elektroğirilmiş nanoyapıların üretilmesinde, her prosese ve üretim amaçlarına özgü ideal koşul/parametrelerin öngörülmesi ve/veya deneysel çalışmalarla belirlenerek bir arada kullanılması, akabinde optimum çalışma şartlarının ortaya çıkarılması esas alınarak sonsuz çeşitlilikte nanoyapılar üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, elektroğirme tekniğinin kullanıldığı biyosensör uygulamalarına bakıldığında, bu teknikten yararlanılarak yapılan çalışmaların uzun yıllar öncesine dayandığı ve başarılı sonuçlar alındığı görülmektedir. Nitekim Liu ve ark. (2008), karbon pasta elektrodun (CPE) karbon nanolifler (CNF) ile modifikasyonunda elektroğirmeden yararlanmış ve eş zamanlı dopamin, askorbik asit ve ürik asit tayinine yönelik yüksek seçicilik ve hassasiyette biyosensör geliştirmiştir. Benzer bir çalışma, Tang ve ark. (2011) tarafından ete ksantin biyosensörü geliştirmek üzere de yapılmıştır (elektroğirme destekli CNF-CPE modifikasyonu). Kant ve ark. (2018) ise balık etinde ksantin tayini için elektroğirme yöntemi ile ürettikleri ve tantalum (v) oksit ( $Ta_2O_5$ ) nano-yapılarına ksantin oksidaz enzimini entegre ederek lifoptik bir biyosensör tasarlamış, söz konusu nanoyapıları enzim için bir immobilizasyon matriksi gibi kullanmışlardır. Verilen örnekler özellikle, bu çalışma kapsamında incelenecek olan ksantin, hipoksantin ve ürik asit tayinine yönelik olup, daha pek çok farklı analitin tayinini mümkün kılan ve elektroğirilmiş nanoyapıların kullanılmış olduğu biyosensör çalışmaları ile örnekler çeşitlendirilebilmektedir (Liu ve ark., 2009; Chen ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2012a; Supraja ve ark., 2020).

## 1.5. Hipoksantin, Ksantin ve Ürik Asit Belirlenmesine Yönelik Biyosensör Çalışmaları

Literatürde hipoksantin, ksantin ve ürik asit tayinine yönelik olarak yapılan biyosensör çalışmaları, elektroğirmeden tekniğini içeren veya içermeyen, enzimatik veya non-enzimatik olma gibi tasarım özellikleri ve kullanılan nanomateryaller göz önüne alındığında büyük bir çeşitlilik göstermektedir. Söz konusu biyosensör çalışmalarının tasarım çeşitliliği ve algılama gücüne dayalı performans özellikleri Tablo 1’te derlenmiştir.

Tablo 1. Literatürde çeşitli numunelerde (kan, idrar, balık, vb.) ksantin, hipoksantin ve ürik asit tayinlerine yönelik olarak geliştirilen elektrokimyasal biyosensör çalışmaları

Elektrot özellikleri (Nanomodifikasyon)	Analitik Performans	Analit/ Matriks	Referans
CPE üzerine XOD immobilizasyonu	LOD: 0,8 $\mu\text{M}$	Hx	Hu ve ark., 2000
Preanodize nontronit kaplı SPE	Hx LOD: 0,32 $\mu\text{M}$ ; Xa LOD: 0,07 $\mu\text{M}$ ; UA LOD: 0,42	Serum ve idrar-Hx, Xn, UA	Zen ve ark., 2002
AuNPs modifiyeli CPE (karbon pasta elektrot)	LOD: $2,2 \times 10^{-7}$ M	Hx-Balık, tavuk eti	Agui ve ark., 2006
Camsı CPE üzerine AuNPs ve XOD modifikasyonu	-	Xn-Hx	Çubukçu ve ark., 2007
Fonksiyonel tek katmanlı karbon nanotüp modifiyeli ultra ince iç katmanlı CPE	Hx LOD: 0,562 $\mu\text{M}$ ; Xa LOD: 0,146 $\mu\text{M}$ ; UA LOD: 0,08 $\mu\text{M}$	İdrar-Hx, Xn, UA	Wang ve ark., 2008
Nafyon-rutenyum dimetil sülfoksit modifiye membran bazlı GCE	Hx LOD: 2,37 $\mu\text{M}$ Xn LOD: 2,351 $\mu\text{M}$ UA LOD: 0,372 $\mu\text{M}$	Çeşitli numuneler-Hx, Xn, UA	Kumar ve Swetha, 2010
Polipirol-Pt elektrot bazlı elektrot	LOD: 6 $\mu\text{M}$	Xn	Lawal ve Adeloju, 2010
pi-pi non-kovalent bağlanma ile PPy ve polistirensülfonik asit-g-pirol ile fonksiyonelleştirilmiş RGO	LOD: 10 nM	Balık-Hx	Zhang ve ark., 2010
Bromokresol moru modifiyeli GCE	Hx LOD: 0,12 $\mu\text{M}$ Xa LOD: 0,06 $\mu\text{M}$ UA LOD: 0,2 $\mu\text{M}$	Serum-Hx, Xn, UA	Wang ve Tong 2010

Karboksillenmiş MWCNT/ polianilin komposite filme XOD immobilizasyonu	LOD: 0,6 µM	Balık-Xn	Devi ve ark., 2011a
XOD/ZnO-NPs-PPy/Pt	LOD: 0,8 µM	Balık-Xn	Devi ve ark 2011b
MWCNT bazlı GCE	Hx LOD: 2,87 µM Xn LOD: 134 nM UA LOD: 141 nM	Balık-Xn, Hx ve UA	Kumar ve Shanmugan, 2011
Poli (PCV)/karboksilli MWCNT kompozit film modifiyeli elektrot	Hx LOD: 0,2 µM; Xn LOD: 0,05 µM; UA LOD: 0,16 µM	Serum-Hx, Xn, UA	Wang, 2011
B-Siklodekstrin/GCE	Xn LOD: 1,25 µM Hx LOD: 5 µM UA LOD: 5 µM DOP LOD: 1,5 µM	İdrar- Hx, Xn, UA, DOP	Gong ve ark., 2012
ZnO-NP/CHIT/c-MWCNT/PANI modifikasyonu ile üretilen enzim biyosensörü (XOD)	LOD: 0,1 µM	Balık eti-Xn	Devi ve ark., 2012a
Au kolloidleri-poliprol nanokompozit film	LOD: 0,4 µM	Tavuk, balık, domuz ve dana eti-Xn	Devi ve ark., 2012b
XOD- Siklodekstrin /AuNPs/SWNT/GCE	LOD: 40 nM	Xn	Villalonga ve ark., 2012
Poli(l-arjinin)/grafen kompozit film modifiyeli elektrot	Hx LOD: 0,10 µM; Xa LOD: 0,05 µM; UA LOD: 0,05 µM	İdrar- UA, Hx, Xn	Zhang ve ark 2012b
Au NPs-Tek Katmanlı Karbon Nanoçubuk bazlı enzim (XOD) biyosensörü	Xn LOD: 0,72 µM Hx LOD: 0,61 µM	Hx, Xn	Zhang ve ark., 2012c
Fonksiyonelleştirilmiş Au@FeNPs /kitosan modifiyeli PGE elektrot bazlı enzim (XOD) biyosensörü	LOD: 0,05 µM	Balık- Xn	Devi ve ark., 2013a
AgNPs /sistein modifiyeli Au elektrot	LOD: 0,15 µM	Xn-Et	Devi ve ark 2013b
XOD ve birlikte ürikaz, polipiropilivinil sülfonat bazlı Pt elektrod	LOD: 2,5 µM	Balık-Hx	Görgülü ve ark., 2013
Poli(L-methionine) modifiyeli GCE	UA LOD: 0,372 µM; Hx LOD: 0,008 µM; Xa LOD: 0,004 µM	Serum-UA, Hx, Xn ve kafein	Ojani ve ark., 2013
Elektrokimyasal RGO modifiyeli elektrot	UA LOD: 8,8 x 10 <sup>-8</sup> µM Hx LOD: 3,2 x 10 <sup>-7</sup> µM Xn LOD: 1,1 x 10 <sup>-7</sup> µM	İnsan kan serumu ve idrar- UA, Hx, Xn, kafein	Raj ve ark., 2013
Karbon film ve CNT modifiyeli elektrot	LOD: 0,75 µM	Balık, karides-Xn	Torres ve ark., 2013
Kitosan-Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -MWCNT modifiyeli GCE	LOD (anodik): 2,0 x 10 <sup>-7</sup> LOD (katodik): 2,0 x 10 <sup>-5</sup>	Balık-Xn	Dalkıran ve ark., 2014

Poliksilitol bazlı GCE	LOD: 4,5 µM	İdrar-Hx	Duo ve ark., 2014
Elektroforetik Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanopartikül (15–20 nm) ve kitosan modifiyeli elektrot	LOD: 1,31 µM	Balık-Xn	Reza ve ark., 2014
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /polianilin nanopartikül modifiyeli nanokompozit bazlı XOD biyosensörü	LOD: 0,1 µM	Tavuk ve balık-Xn	Sadeghi ve ark., 2014
Poli (GMA-co-VFc)/RGO-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanomodifiye elektrot	LOD: 0,12 µM	Balık	Dervisevic ve ark., 2015
Manyetik nanomaptikül ve karbon nanotüp bazlı elektrot ara yüzü	LOD: 0,05 µM	Balık-Xn	Jain ve ark., 2015
Politreonin bazlı CPE	Hx LOD: 100 µM Xn LOD: 80 µM	Hx, Xn	Juban ve Billione, 2015
Poli(6-tioguanin) film modifiyeli GCE	Hx LOD: 0,10 µM; Xa LOD: 0,30 µM; UA LOD: 0,06 µM	Serum ve idrar-UA, Hx, Xn	Lan ve ark., 2015
Sülfonik gruplar ile fonksiyonelleştirilmiş azot katkılı grafen elektrot	UA LOD: 0,05 µM; Hx LOD: 0,231 µM; Xn LOD: 0,084 µM	Serum ve idrar-UA, Hx, Xn	Luo ve ark., 2015
Enzim modifiyeli GCE-çok katmanlı karbon nanotüp ve nanogold (altın) polimer kompozit temelli sensör film	LOD: 12 nM	Xn	Sen ve Sarkar, 2015
RGO/ZnO nanokompozit bazlı non-enzimatik sensör	LOD: 1,67 µM	Balık-Xn	Zhang ve ark., 2015
Nafyon, TiO <sub>2</sub> - grafen bazlı GCE	LOD: 9,5 µM	Et-Hx	Albeda ve ark., 2017
RGO/PtNP-PAMAM-MNP/GO-CMC/GCE	LOD: 0,013 µM	Balık-Xn	Borisova ve ark., 2016
XOD/AuNP/PtNP/ çok katmanlı karbon nanotüp hibrit nanokompozit modifiyeli GCPE	-	Sentetik serum örneği- Xn	Çevik, 2016
Grafen/Kobalt oksit NP/Kitosan kompozite bazlı elektrot	LOD: 0,2 µM	Balık-Hx	Dalkıran ve ark., 2016
SPE-PB/XOD/nafyon	LOD: 0,4 µM	Tıbbi bitkilerde XOD inhibitörü tespiti-Hx	El Harrad ve Amine, 2016
Bor katkılı CeO <sub>2</sub> nanoküp modifiyeli camı karbon mikrokürecik bazlı electrode (B-CeO <sub>2</sub> NCs/GCPE)	Xn LOD: 3,65 Hx LOD: 8,17 nM	Biyolojik sıvılar ve balık eti-Xn	İbrahim ve Temerk, 2016
GCPE modifiyeli with poröz silika nanomateryal bazlı enzim (XOD) biyosensörü	LOD: 0,28 µM	Balık-Xn	Saadaoui ve ark., 2016
Kitosan/Polipyrrol/AuNPs nanokompozit	LOD: 0,5 µM	Et, balık, tavuk-Xn	Dervisevic ve ark., 2017a
Co-CeO <sub>2</sub> modifiyeli GCE	UA LOD: 0,331 µM; Hx LOD: 0,36	İdrar-Hx, Xn, UA	Lavanya ve ark.; 2016

	$\mu\text{M}$ ; Xn LOD: 0,096 $\mu\text{M}$		
REGO-NP (Pt, Pd ve Au) bio-nanokompozit film	LOD: 3 nM	Et-Xn	Dervisevic ve ark., 2017b
ZnO-CNT, ZnO-CB, ZnO-GO ve ZnO nanopartiküller ile karşılaştırmalı tasarım	LOD: 0,16 nM; (en etkili nanomodifikasyon ZnO-CNT NCs/Nafyon/GCE)	Xn	Rahman ve ark., 2017
Grafen/kobalt oksit nanopartiküllü kitosan kompoziti	LOD: 0,20 $\mu\text{M}$	Balık-Xn	Dalkıran ve ark., 2017
Çok katmanlı karbon nanotüp /TiO <sub>2</sub> nano-biokompozitler	LOD: 0,5 $\mu\text{M}$	Balık-Xn	Narang ve ark., 2017
4B-PGE	Hx LOD: 1,09 $\mu\text{M}$ Xn LOD: 0,40 $\mu\text{M}$ UA LOD: 0,17 $\mu\text{M}$	Balık-Hx, Xn, UA	Vishnu ve ark., 2017
PVF + XOD-/Pt	LOD: 0,52 $\mu\text{M}$	Biyolojik matriksler-Xn	Wang, 2017
ZnO nanopartikül nanomodifikasyonu- çok katmanlı karbon nanotüp -1,4-benzokinon kompoziti (XOD enzim biyosensörü)	LOD: $2,1 \times 10^{-7}$ M	Tavuk eti ve dana eti-Xn	Dalkıran ve ark., 2018
Pirolitik grafit elektrot	Xn LOD: 0,06 $\mu\text{M}$ Hx LOD: 0,08 $\mu\text{M}$ UA LOD: 0,03 $\mu\text{M}$	Balık-Xn, Hx, UA	Pierini ve ark., 2018
Pozitif yüklü polidimetil amonyum-CNT-grafen bazlı elektrot	LOD: 4,40 $\mu\text{M}$	Serum ve tampon-Xn	Si ve ark., 2018
RGO/Polipirol/CdO	LOD: 0,11 $\mu\text{M}$	Balık-Xn	Ghanbari & Nejabati, 2019
Ag katkılı ZnO-Np (nano Ag-ZnO) ile iletken polimer PPy elektropolimerizasyonu bazlı PGE enzim (XOD) biyosensörü	LOD: 0,07 $\mu\text{M}$	Balık-Xn	Şahyar ve ark., 2019
Cu-MOF nanolif modifiyeli elektrot bazlı enzim (XOD) biyosensörü	Hx LOD: 0,0023 ve Xn LOD: 0,0064 $\mu\text{M}$	Donuk deniz ürünleri-Hx, Xn	Wang ve ark., 2019
GCE üzerine XOD immobilizasyonu için çok katmanlı karbon nanotüp ve poli(L-aspartic acid) (Poly(L-Asp)) film tasarımı biyosensör	LOD: $3,5 \times 10^{-4}$ $\mu\text{M}$	Balık eti-Xn	Yazdanparast ve ark., 2019
Pt-NP katkılı MOF (MIL-101 (Cr))	LOD Xn: 0,42 $\mu\text{M}$	Spike yapılan serum örnekleri DOP-Xn-Hx-UA	Zhang ve ark., 2019

GCE üzerinde ferrosin, heteropoliasit ve grafen bazlı non-enzimatik sensör	LOD: $1,01 \times 10^{-8}$ M	İnsan idrarı-Xn	Zhu ve ark., 2019
Pt yüzeye polipirol-paratoluensülfonat modifikasyonu ile XOD ve ürikaz enzim immobilizasyonu (enzim biyosensörü)	LOD: $5 \times 10^{-6}$ M	Sentetik numuneler-Xn	Erol ve ark., 2020
GCE/PEDOT:PSS-AuNPs	LOD: 300 $\mu$ M	Et ve balık-Xn	Khan ve ark. 2020
Polidopamin ve karbon nanoliflerle modifiyeli enzim biyosensörü	LOD: 2 $\mu$ M	Göz camısı cisim-Hx	Liao ve ark., 2020
XOD NP modifiyeli Au elektrot (kovalent bağ immobilizasyonu)	LOD: 0,01 $\mu$ M	Balık eti-Xn	Joon ve ark. 2021
XOD immobilize edilmiş Au NPs/c- çok katmanlı karbon nanotüp bazlı SPE	LOD: 1,14 nM	Balık-Xn	Sharma ve ark., 2021
3-D poröz grafen bazlı elastik nanozim elektrot	Xn LOD: 0,26 $\mu$ M; Hx LOD: 0,18 $\mu$ M	Balık eti-Hx, Xn	Zhu ve ark., 2021
İndium tin oksit kaplı camısı yüzeye XOD immobilize edilmiş polianilin-sargılı titanium dioxide (PANI@TiO <sub>2</sub> ) nanohibrit yapı modifikasyonu	LOD: 0,01 $\mu$ M	Et ve balık-Xn	Thakur ve ark., 2022
Kitosan-kaplama ve glutatyon-katmanlı bakır nanokümecek kombinasyonlu (CS-GSH-CuNCs) fotoelektrokimyasal sensör	LOD: of 6,6 nM	İdrar ve diğer numuneler-Xn	Chen ve ark., 2022
Bruşit (CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) nanopartikül bazlı GCE elektrot	UA LOD: 0,576 $\mu$ M; Xn LOD: 1,0 $\mu$ M ve Hx LOD: 0,076 $\mu$ M	İnsan idrarı ve kahve-Hx, Xn, UA	Sudhan ve ark., 2022
NiO Nanomodifiyeli elektrot (XOD biyosensörü)	LOD: 37 nM	Balık-Xn	Tripathi ve ark., 2022
Molibdenumdisülfid-molibdenumtrioksit (MoS <sub>2</sub> /MoO <sub>3</sub> ) nanohibrit bazlı enzim biyosensörü (XOD/MoS <sub>2</sub> /MoO <sub>3</sub> /ITO)	LOD: 64 nM	Balık-Xn	Sharma ve ark., 2023

Tablo 1’de, çeşitli elektrot materyallerinin (PGE, GCE, CPE, vb.) farklı nanomateryallerle modifikasyonu sonucunda 0,16 nM’den 10  $\mu$ M’a kadar değişen algılama gücündeki sensör ve biyosensör tasarımlarının elde edildiği görülmektedir. Çalışmalarda kan serumu, idrar, kahve, balık, et gibi çok çeşitli biyolojik numunelerin ksantin, hipoksantin ve ürik asit içerikleri ayrı ayrı (tek analit) veya eş zamanlı (çoklu) tayini gerçekleştirilmiştir.

## İKİNCİ BÖLÜM

### MATERYAL-YÖNTEM

#### 2.1. Materyal

##### 2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Çalışmada, potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), potasyum hidrojen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ), Merck (Darmstad, Almanya) firmasından; Poliakrilonitril (PAN), Polipirol, N,N-Dimetilformamid (DMF), sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ ), ksantin, hipoksantin, ürik asit, dopamin hidroklorür, L-aspartik asit ve 5 U'luk ksantin oksidaz enzimi (sığır sütünden, I.sınıf, 14 mg protein/ml) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiş olup tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Tüm tampon çözeltiler için 18.2  $\Omega$  Ultra saf su kullanılmış ve tampon çözeltiler +4°C'de muhafaza edilmiştir. Diğer çözeltiler ise taze hazırlanarak kullanılmıştır. Çözeltilerin pH ayarlamaları 0.1 N  $\text{NaOH}$  veya 0.1 N  $\text{HCl}$  ilavesiyle yapılmış olup deneysel çalışmalar oda sıcaklığında (yaklaşık 25.0 °C) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca nanomodifiye elektrot yüzeylerinin üretimi için 0.5 HB Tombo kalem uçları temin edilmiştir. Kullanılan tüm çözeltiler, içerikleriyle beraber Tablo 1'de verilmiştir.

Mikrobiyolojik analizler için kullanılan besiyerleri ise toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı (TMAB) için "Plate Count Agar" (BD, New Jersey, ABD) ve olası toplam koliform bakteri sayısının belirlenmesi için "Lauryl Sulphate Tryptose Broth" (Merck, Almanya) toz formda temin edilmiş ve besiyerleri, kutu ambalajı üzerindeki talimatlara göre hazırlanmıştır.

Tablo 2. Deneyleerde kullanılan çözeltiler ve içerikleri

<b>Çözeltiler</b>	<b>İçerik</b>
<b>0.05 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (pH 7.4)</b>	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 40 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ve 20 mM NaCl ultra saf su ile hazırlanmıştır.
<b>PAN Nanolif Solüsyonu</b>	8 wt% PAN olacak şekilde N,N-dimetilformamid (DMF) ile hazırlanmıştır.
<b>2 M NaOH Solüsyonu (Elektrotların ön muamelesi)</b>	80 g sodyum hidroksit (NaOH) / 1 L ultra saf su olacak şekilde hazırlanmıştır.
<b>Ölçüm Solüsyonu</b>	0.05 M PBS (pH: 7,0) kullanılmıştır
<b>Ksantin, hipoksantin, ürik asit, dopamin ve L-aspartik asit çözeltileri</b>	Her bir analitten taze 1 mM stok çözelti 0.05 M PBS (pH: 7,0) içerisinde hazırlanmış ve sonrasında yine PBS ile farklı konsantrasyonlara (10, 20, 50, 100 ve 200 mikro molar) ayarlanmıştır
<b>Ksantin oksidaz (XOD) çözeltisi</b>	Hazır süspansiyon (amonyum sülfat içerisinde)

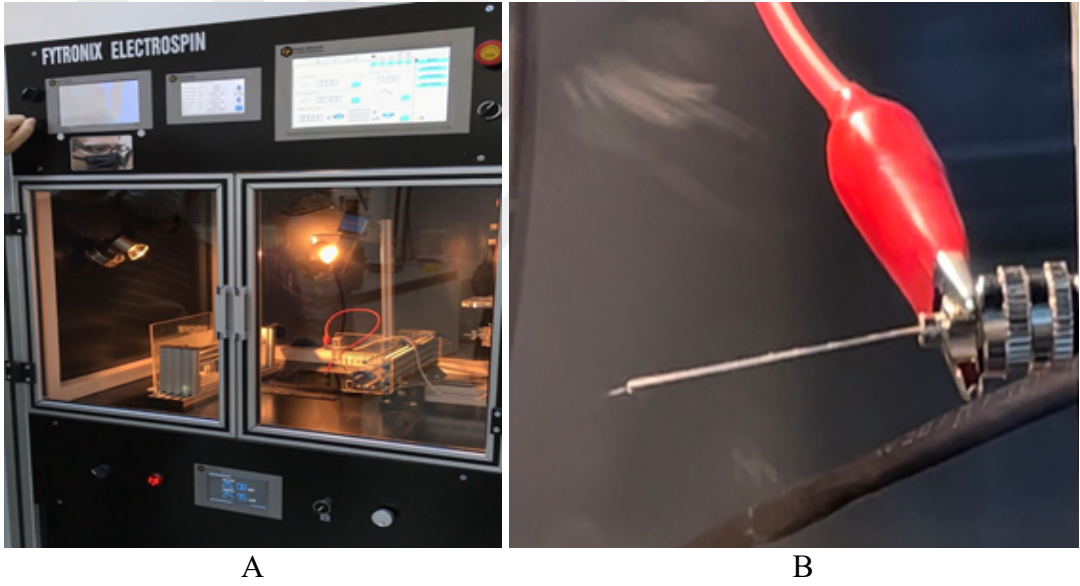
### 2.1.2. Balık Numunesi

Balık numunesi olarak, İzmir’de yetiştirilen ve standart boyutlardaki 1 kg’lık çiftlik çipura balıkları iç organları çıkartılmaksızın taze olarak yerel zincir marketten temin edilmiştir.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Elektroğirilmiş PAN Nanolifler ile Elektrot Modifikasyonu

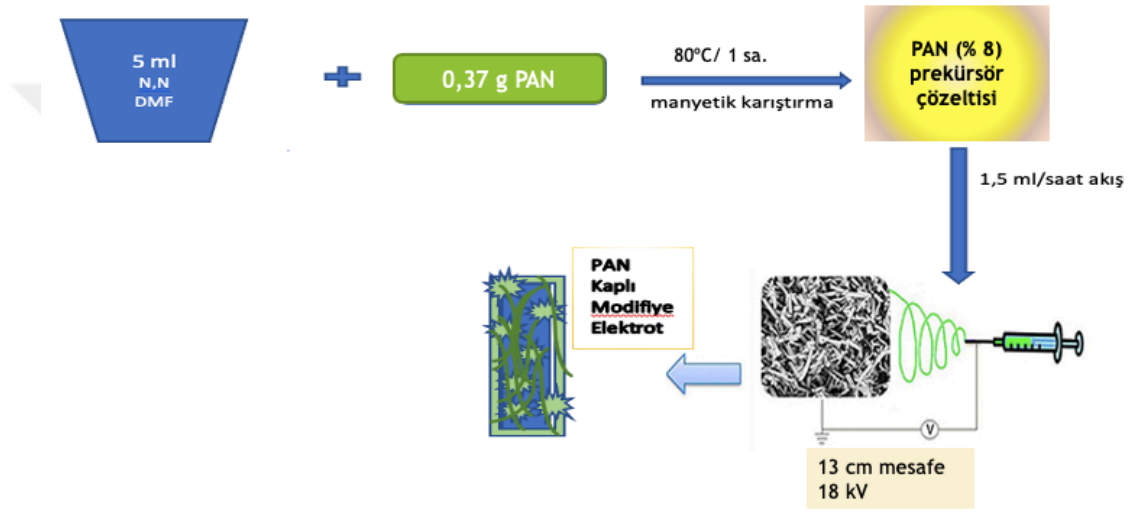
Bir şırınga pompası ve nanolif üretimi için yüksek voltaj kaynağı içeren ve Şekil-2’de görülen elektroğirme sistemi kullanılarak (Fytronix ES-9000, Türkiye) PAN nanolifler, kolektör (toplayıcı) kısımda konumlandırılan ve 3 cm uzunluğunda kesilmiş kalem ucu elektrotlar (PGE) üzerine kaplanmak suretiyle modifikasyon gerçekleştirilmiştir. Nanomodifiye elektrotların yüzey karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM, Geminisem Zeiss, Almanya) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak belirlenmiştir. Modifiye elektrot yüzeylerinde görüntülenen nanolif çaplarının belirlenmesi ve histogram grafiklerinin oluşturulması ise “Image J” programı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. (A) Elektroğirme cihazı (FYTRONIX ES-9000), (B) Taylor konisi

Elektrot modifikasyonunda Kıvrak ve ark. (2020)’nin yöntemi, bazı değişiklikler yapılarak Şekil-3’teki gibi uygulanmıştır. Buna göre 0,37 g PAN, 5 ml N,N-dimetil formamid (DMF) içerisinde manyetik karıştırıcı ile 80°C’de 1 saat karıştırılarak elektroğirme işlemi için homojen bir polimer çözeltisi elde edilmiştir. Ardından, bir parça alüminyum folyo üzerine yapıştırılmış 3 cm uzunluğundaki PGE elektrotlar, elektroğirme silindirin üzerine sarılmıştır. Polimer çözelti, 18 kV’da 13 cm mesafeden 5 µl/dk. akış hızıyla elektrotlar üzerine eğrilmiştir. Modifiye elektrotlar

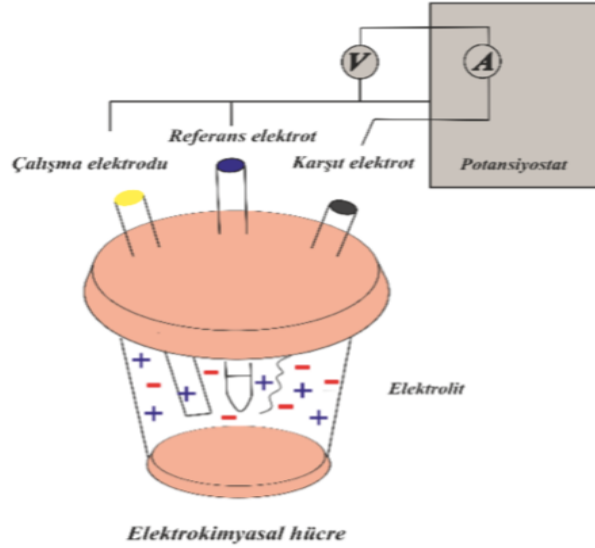
doğrudan kullanılmayıp, 2 M NaOH çözeltisine daldırılmış olarak 40 °C'de 1 saat boyunca ön işleme tabi tutulmuştur. Böylece PAN'ın nitril (-CN) gruplarının karboksil (-COOH) ve amin (-NH<sub>2</sub>) gruplarına dönüştürüldüğü bir yüzey fonksiyonelleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yalın (kaplanmamış) kalem uçları ile yapılan ön deneme ve referans çalışmaların öncesinde ise elektrokimyasal ölçüm hücresinde, 0,05 M PBS (fosfat tamponu) içerisinde, 0,1V-1,4 V voltaj aralığında ve elektrotların her birine tek tek uygulanmak suretiyle (1,5 dk/elektrot) bir yüzey aktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. PGE yüzeylerin elektroçirilmiş PAN nanolifler ile modifikasyonunda belirlenen üretim parametreleri

### 2.2.2. Üçlü Elektrot Sistemi

Üçlü elektrot sistemi Ag/AgCl referans elektrodu, karşı elektrot olarak platin tel ve çalışma elektrodu olarak kalem ucu grafit elektrottan (PGE) oluşmaktadır. Bu sistem, Şekil 4'te şematize edilmiştir. Voltametrik (DPV) ölçümler için Autolab-Pgstat-Fra12 cihazı ve MetrOhm Drop Sense potansiyostat cihazları ve elektrokimyasal analizör olarak Nova 10.1 ve Dropview yazılımlarından yararlanılmıştır.



Şekil 4. Üçlü elektrot sistemi

### 2.2.3. Optimizasyon Çalışmaları

#### 2.2.3.1. Yalın PGE (Kaplanmamış Elektrot) ile Analitlerin Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Yalın PGE yüzeylerle ksantin, hipoksantin ve ürik asitin yanı sıra non-spesifik dopamin (DOP) ve L-aspartik asit (L-ASP) moleküllerinin tampon çözelti içinde elektrokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ksantin, hipoksantin, ürik asit, dopamin ve L-aspartik asit çözeltilerinin her biri, PBS (pH: 7,0) içerisinde 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$  olmak üzere 5 ayrı konsantrasyonda hazırlanmak suretiyle DPV ölçümlerine tabi tutulmuş ve sonrasında karışım çözeltileri hazırlanarak ölçümler tekrarlanmış ve pik potansiyelleri ile pik yükseklikleri (nano amper) belirlenmiştir. Çalışma, üç tekerrür ve beş paralel olarak gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları ortalama $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

#### 2.2.3.2. PAN Nanomodifiye PGE Yüzeyleri ile Analitlerin Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Elektroğrılmış PAN nanolifler ile modifiye edilen PGE yüzeyler kullanılarak ksantin, hipoksantin ve ürik asitin yanı sıra nonspesifik DOP ve L-ASP moleküllerinin tampon (0,05 M PBS, pH=7) ile hazırlanan 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerinin elektrokimyasal davranışları monitorize edilmiş, sonrasında

karışım çözeltileri hazırlanarak tekrarlanan DPV ölçümleri sonucunda elektrokimyasal karakterizasyon gerçekleştirilmiştir. Modifiye yüzeylerin üretimi ve akabinde gerçekleştirilen DPV ölçümleri üç tekerrür ve beş paralel olarak gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları ortalama± standart sapma olarak verilmiştir.

#### **2.2.3.3. PAN Nanomodifiyeli PGE Yüzeyleri ile Seçicilik Çalışması**

Bu amaçla tampon çözelti içine sırasıyla L-aspartik asit, dopamin, ksantin, hipoksantin ve ürik asit ilave edilerek elde edilen karışımda DPV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Böylece, gerçek örneğe yakın bir karışım elde edilmiş olup bu karışım ortamındaki bileşenlerin elektrokimyasal ayırımı ve görüntülenmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada kullanılacak olan derişimlerin gerçek örneğe yakın olması amacıyla, balığın bozunma sürecinde oluşan miktara yakın konsantrasyonlar ve nötral pH'da tampon çözeltisi (PBS pH=7) ile çalışılmıştır. Modifiye yüzeylerin üretimi ve akabinde gerçekleştirilen DPV ölçümleri üç tekerrür ve beş paralel olarak gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları ortalama± standart sapma olarak verilmiştir.

#### **2.2.3.4. Kontrollü Bozunma Koşullarında Elektrokimyasal Ölçümler**

Ksantin oksidaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen kontrollü bozunma çalışması kapsamında, Hx içeren çözelti içine farklı derişim ve sürelerde XOD ilave edilerek Xn ve UA oluşumu sağlanmıştır.

Süre çalışmasında, 200 µM'lık Hx çözeltilerine 1,1 U'luk XOD enzim muamelesinin 0.dk, 7,5.dk, 15.dk, 22,5.dk ve 30.dakikalarındaki DPV ölçümleriyle ksantin, hipoksantin ve ürik asitin eş zamanlı elektrokimyasal monitorizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Konsantrasyon çalışması Avan ve ark. (2023) referans alınarak planlanmıştır. 200 µM'lık Hx çözeltileri, sabit sürede (15 dk.) sırası ile 0,55 U; 1,1 U; 2,2 U; 5,5 U ve 11 U olmak üzere farklı konsantrasyonlarda XOD ile ayrı ayrı muamele edilmiş ve Hx, Xn, UA'nın eş zamanlı elektrokimyasal monitorizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu uygulamalardaki amaç, balığın bekleme süresince aktif olan enzimin farklı zamanlarda oluşturduğu bozunma ürünlerinin eşzamanlı olarak kontrollü bir şekilde görüntülenebilirliğinin değerlendirilmesidir. Modifiye yüzeylerin üretimi ve akabinde

gerçekleştirilen DPV ölçüm çalışmaları üç tekerrür ve beş paralel olarak gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları ortalama± standart sapma olarak verilmiştir.

#### **2.2.3.5. Tespit Limiti (LOD) ve Miktersal Tayin Limiti (LOQ) Belirlenmesi**

LOD ve LOQ belirlenmek üzere 1 mM'lık stok ksantin, hipoksantin ve ürik asit çözeltilerinden 1, 2, 5 ve 10 µM'lık karışımlar hazırlanmış ve bu çözeltiler ile alınan elektrokimyasal yanıtlar ölçümlenmiştir. Hesaplamalarda;

$$\text{LOD} = 3 * \text{SD} / m$$

$$\text{LOQ} = 10 * \text{SD} / m$$

“SD” tampon çözeltideki ölçüm değerlerinin standart sapması ve “m” doğru denkleminin eğimi olmak üzere her bir analit için elde edilen doğru denklemleriyle LOD ve LOQ hesaplanmıştır. Modifiye yüzeylerin üretimi ve akabinde gerçekleştirilen DPV ölçüm çalışmaları üç tekerrür ve beş paralel olarak gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları ortalama± standart sapma olarak verilmiştir.

#### **2.2.3.6. Elektrot Depolama ve Ölçümlerde Sapma Oranı**

Yeterli sayıda üretilen PAN nanomodifiyeli PGE elektrotlar, 4°C ve 25°C'de 30 gün muhafaza edildikten sonraki ölçüm performansları, LOD'ye en yakın olan 10 µM'lık konsantrasyona ait sonuçlar baz alınarak taze elektrotları ile karşılaştırılmış ve (%) sapma oranı olarak ifade edilmiştir.

#### **2.2.3.7. Gerçek Örneklerde Nanobiyosensörün Uygulanması**

Balık numunesi aseptik şartlarda temizlendikten sonra mikrobiyolojik analizler (Toplam Aerobil Mezofilik Bakteri Sayımı: TMAB ve olası toplam koliform bakteri sayısının belirlenmesi), pH ölçümleri ve DPV ölçümleri için uygun şekilde ve miktarda porsiyonlanarak buzdolabı koşullarında (4°C) ve orta boy buzdolabı poşetlerinde depolanmıştır. Tüm analizler, depolamanın 0. ve 1. günlerinde, devamında ise 3.gün, 5.gün şeklinde gün aşırı sıklıkta balık bozuluncaya kadar gerçekleştirilecek şekilde planlanmıştır.

### **2.2.3.7.1. Mikrobiyolojik Analizler**

10 gram örnek steril homojenizatör poşetine aktarıldıktan sonra üzerine 90 ml %0,1'lik peptonlu su ilave edilip 2 dk homojenizatörde (BagMixer, Interscience, Fransa) tutulmuştur. Elde edilen homojenattan %0,1'lik peptonlu su ile seri dilüsyonlar hazırlanmış ve her dilüsyon için çift petriye dökme plak yöntemi ile ekim yapılarak TMAB analizi için 30°C ± 1°C'de 48 ± 3 saatlik inkübasyon koşulları sağlanmıştır. Sonuçlar, numunenin gramı başına koloni oluşturan birim (kob/g) olarak ifade edilmiştir (TS EN ISO 4833-1, 2014). Olası toplam koliform bakteri sayısının belirlenmesinde ise her dilüsyondan Laurly Sulfate Tryptose Broth besi yeri içeren 3'er tüpe 1'er ml ekim yapılmış ve 37°C'de 24-48 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda gaz oluşumu görülen tüplerin sayısına göre En Muhtemel Sayı Yöntemi (EMS) ile sonuç belirlenmiştir (Baumgart, 1986).

### **2.2.3.7.2. pH Ölçümleri**

5 gram numune üzerine 5 ml distile su ilave edilip vorteks ile karıştırıldıktan 10 dakika sonra WTW Inolab pH 7310 masa tipi pH metre ile ölçüm alınmıştır (Manthey ve ark., 1988).

### **2.2.3.7.3. Elektrokimyasal (DPV) Ölçümler**

2 gram örnek üzerine 10 ml 0,05 M (pH=7) PBS tampon çözeltisi ilave edilip 5 dk karıştırıldıktan sonra 4000 rpm / 15 dk'lık santrifüjleme işlemine tabi tutulmuş ve sıvı faz süzülüp 100 µL filtrat alınıp 10 ml'ye tamamlanarak karıştırıldıktan sonra elektrokimyasal ölçüm hücresinde analiz edilmiştir (Wang ve ark., 2019).

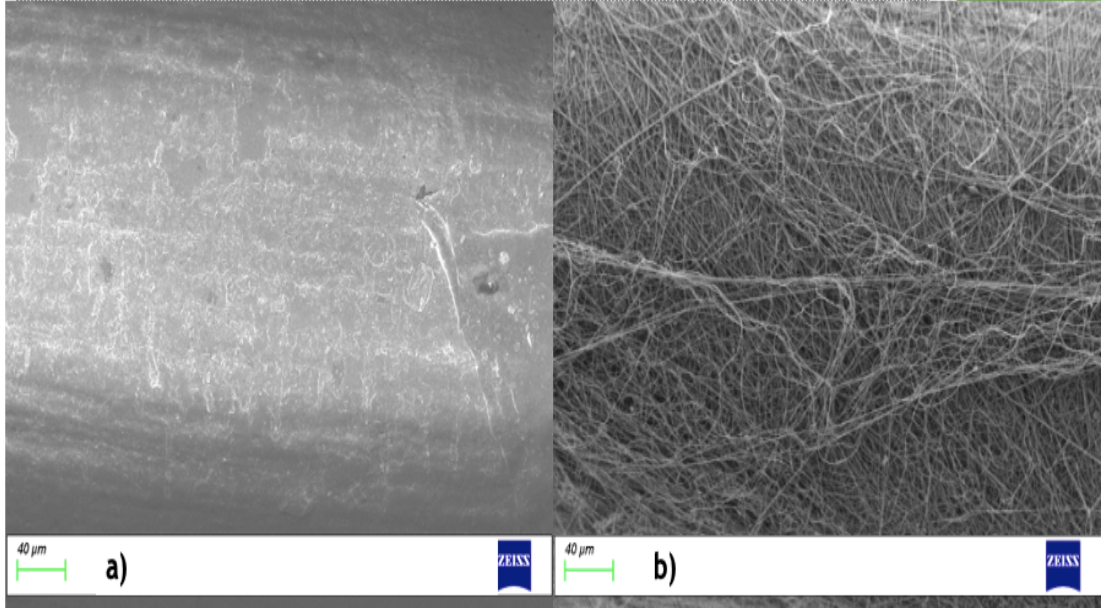
## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Elektroğirme Gerçekleştirilerek PAN Nanolifler ile Kaplanmış Sensör Yüzeylerinin Karakterizasyonu

Elektroğirme işlemiyle elektrot yüzeylerinin nanomodifikasyonuna yönelik olarak deneme üretimleri gerçekleştirilmiştir. Deneme üretimleriyle elde edilen elektrotlar kullanılarak gerçekleştirilen DPV ölçüm sonuçlarının, nanomodifiye elektrot tasarımına yönelik optimum çalışma parametrelerinin seçiminde referans olması amaçlanmıştır.

Kaplanmamış (yalın PGE) ve kaplanmış (PAN nanomodifiyeli) elektrotların SEM görüntüleri Şekil 5'te verilmiş olup, 18 kV, 13 cm mesafe 5 µl/ dk akış debisiyle üretilen elektroğirilmiş PAN nanoliflerin başarılı biçimde elektrot yüzeyine kaplandığı anlaşılmaktadır.



Şekil 5. a) Yalın PGE (kaplanmamış) elektrot yüzeyi ve b) Elektroğirilmiş PAN nanolifler ile modifiye edilmiş PGE elektrot yüzeyi

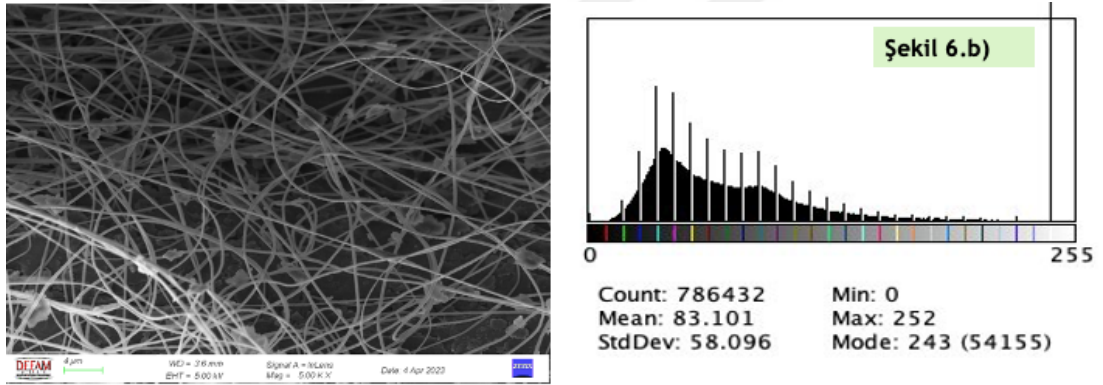
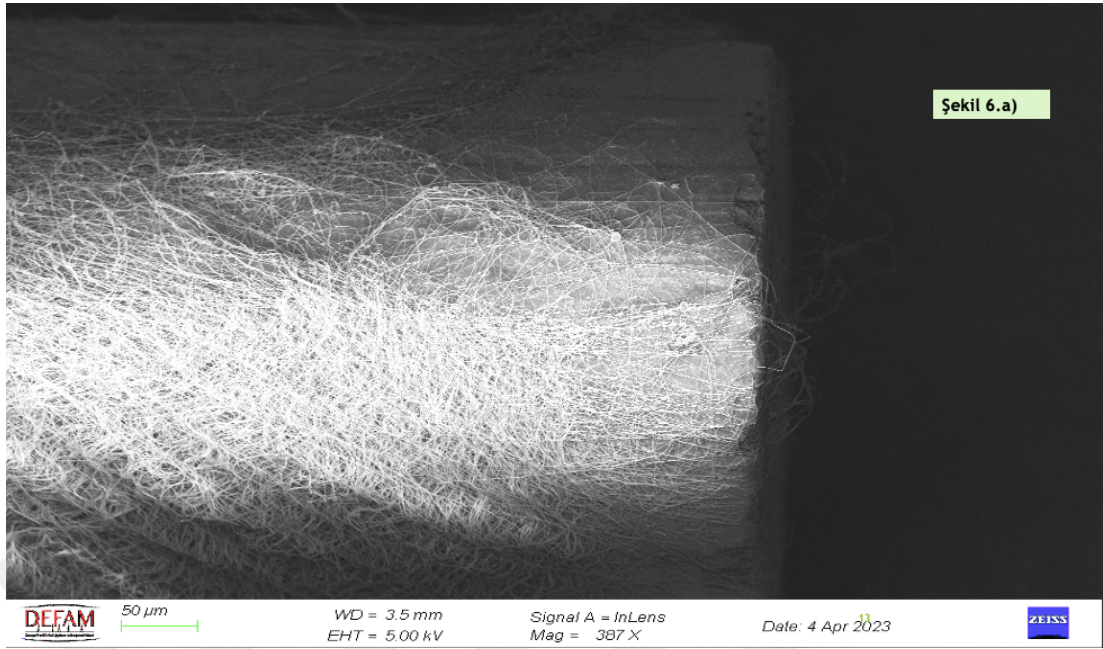
Şekil 5-a'da, kaplanmamış elektrot yüzeyinde pürüzsüz görümlü karbon grafit yapısı dikkati çekerken, Şekil 5-b'de PGE yüzeyi yoğun olarak kaplayan PAN

nanolifler, analitler ile etkileşime geçebilecek yüzey alanını artırarak geniş bir reaksiyon yüzeyi teşkil etmektedir.

İlk iki üretiminde, iki farklı uygulama mesafesi denenmiş ve diğer tüm parametreler sabit tutulmak suretiyle elektroğrılmış PAN nanolifler PGE yüzeylere kaplanmış olup bu nanoliflerin SEM görüntüleri, histogram grafikleri ile beraber Şekil 6 ve Şekil 7’de verilmiştir. Üretimlere ait tüm parametreler elde edilen ortalama nanolif çapları ile beraber Tablo 3’te verilmiş ve ayrıca literatür karşılaştırması yapılmıştır.

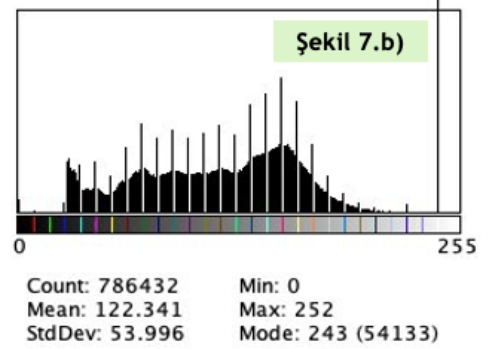
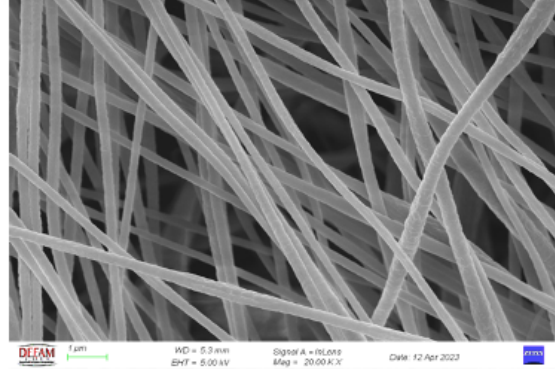
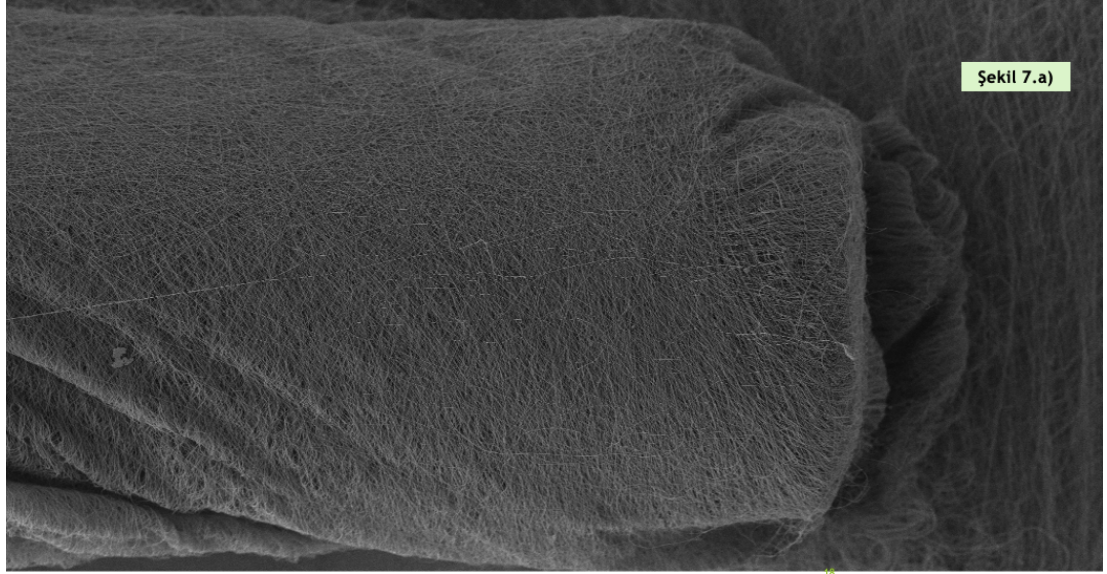
Tablo 3. PAN nanolif üretimlerinin uygulama parametreleri ve elde edilen nanoliflerin çap bakımından karşılaştırılması

Üretim No	Üretim Parametreleri	Nanolif Çapları (nanometre: nm)
1	18 kV 16 cm mesafe 5 µl/ dk akış 2 saat uygulama süresi Prekürsör çözelti: 1,48 g PAN + 20 ml DMF + 0,164 g PP (7 gün/60°C karıştırma)	83,10 ±58,10
2	18 kV 13 cm mesafe 5 µl/ dk akış 2 saat uygulama süresi Prekürsör çözelti: 1,48 g PAN + 20 ml DMF + 0,164 g PP (7 gün/60°C karıştırma)	122,34 ±53,99



Şekil 6.a) 1. Üretimden elde edilen nanomodifiye PGE elektrodun genel görünümü b) Elektrodun bir bölümünden yakınlştırılmış görüntüsü

Şekil 6.a'da elektrodun genel görünümü, Şekil 6.b'de ise elektrodun yakınlştırılmış görüntüsü ve nanoliflerin ortalama çapı ( $83,10 \pm 58,10$  nm) verilmektedir. Nanoliflerin damlacık kusurları içermeyen düzenli bir morfolojik yapıya sahip olduğu, bir başka deyişle düzgün ve boncuksuz nanoliflerin oluştuğu görülmektedir.



Şekil 7.a) 2.Üretimden elde edilen nanomodifiye PGE elektrodun genel görünümü b) Elektrodun bir bölümünün yakınlaştırılmış görüntüsü

Şekil 7.a'da elektrodun genel görünümü, Şekil 7.b'de elektrodun yakınlaştırılmış görüntüsü ve nanoliflerin ortalama çapı ( $122,34 \pm 53,99$  nm) yer almaktadır. Bu üretimde de nanoliflerin düzgün ve boncuksuz yapıda olduğu anlaşılmıştır.

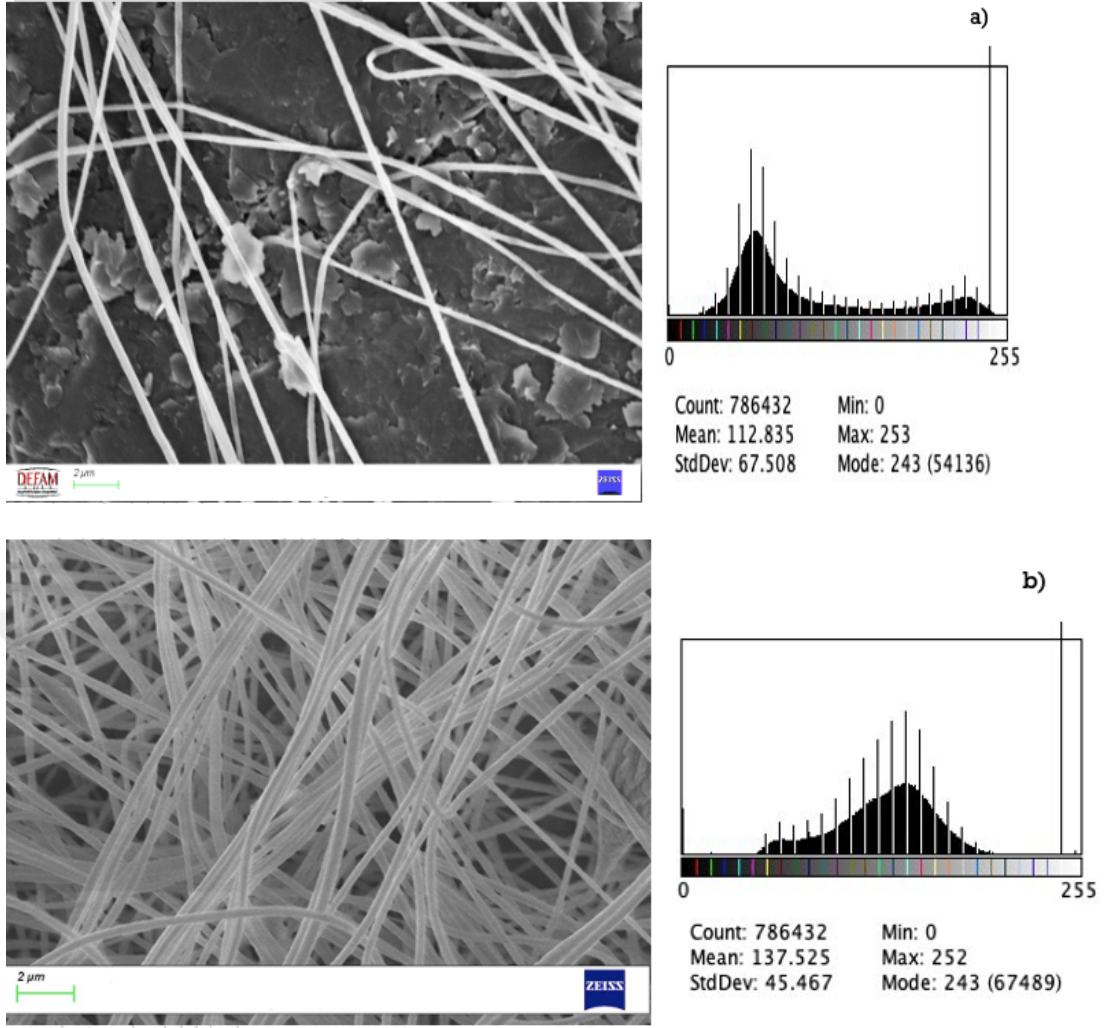
% 0,8 PPy kullanılarak hazırlanan prekürsör çözeltiyle gerçekleştirilen iki üretim birbiriyle kıyaslandığında, Tablo 3'te görüldüğü gibi elektroçirime iğnesinin kolektöre uzaklığındaki 3 cm'lik azalma ile ortalama nanolif çapında küçük bir artış gözlenmiştir. Dolayısıyla elektroçirime prosesinde nanolif çapı üzerine etkili olabilen parametreler arasında yer alan mesafenin nanolif çapıyla ters orantılı bir değişim gösterebildiği tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ayrıca literatür ile kıyaslandığında, Tang ve ark. (2011) tarafından non-enzimatik amperometrik ksantin biyosensörü için üretilen ve CPE (karbon pasta elektrot) üzerine elektroğrilen PAN nanolif (CNF) çapları 200-400 nm aralığında, Nasouri ve ark. (2012) tarafından üretilen elektrospun PAN nanolif çaplarının 80-162 nm aralığında, Ahmad ve ark. (2022) tarafından Xn ve UA tayinine yönelik olarak üretilen elektroğrilmış Co-MOF nanolifleri 280-300 nm aralığında değişim göstermiştir. Yöntemi referans alınıp modifiye edilerek uygulanan Kıvrak ve ark. (2020)'nin ürettiği elektroğrilmış PAN/PPy nanoliflerin ortalama çapı ise 160 nm olarak kaydedilmiştir. Böylece, bu tez çalışması kapsamında yapılan üretimler ile daha düşük ortalama çapa sahip nanoliflerin elde edildiği anlaşılmaktadır.

Buna karşılık, prekürsör çözelti formülasyonunun nanolif çapları ve elektrokimyasal performansa etkisi incelenerek optimum bileşimin belirlenmesi amacıyla değişen polipirol (PPy) oranlarında hazırlanan prekürsör çözeltiler ile elektrot üretimleri tekrar edilmiştir. PPy'nin, stabilitesi yüksek, kolay sentezlenebilen, biyouyumluluğu ve iletkenliği yüksek bir polimer olduğu ifade edilmekte ve PPy içeren nanolif sistemlerindeki iletkenliğin, metal iletkenliğine ulaşabilen bir ağ yapısı oluşturduğu da belirtilmektedir. Bu özelliklerin yanı sıra PPy'nin düşük çözünürlüğü ve zayıf mekanik özelliklerinin geliştirilmesinde hidrofil karakterli, stabil ve yapışkanlık (adhezyon) özelliklerinden ötürü PAN ile karışım halinde kullanıldığı uygulamalar mevcuttur (İnce-Yardımcı, 2022). Buradan hareketle, artan PPy konsantrasyonunun iletkenliği artırmak suretiyle sensör özelliklerini iyileştirmesi öngörülerek yapılan üretimler sonucunda elden edilen elektrotların performansına göre ideal çözelti formülasyonu belirlenmiştir. PPy'nin standart çözeltilerdeki konsantrasyonu yarıya indirilerek ve PPy formülasyondan tamamen çıkarılarak gerçekleştirilen iki ayrı elektrot üretimine ait SEM görüntüleri ve ortalama lif çapları Tablo 4'te ve Şekil 8'deki gibidir.

Tablo 4. PAN nanolif üretimlerinde farklı PPy kullanımına göre elde edilen nanoliflerin çap bakımından karşılaştırılması

Üretim No	Üretim Parametreleri	Nanolif Çapları (nanometre: nm)
3	18 kV 13 cm mesafe 5 µl/ dk akış 2 saat uygulama süresi Prekürsör çözelti: 1,48 g PAN + 20 ml DMF + 0,82 g PP (7 gün/60°C karıştırma)	112,83±67,50
4	18 kV 13 cm mesafe 5 µl/ dk akış 2 saat uygulama süresi Prekürsör çözelti: 1,48 g PAN + 20 ml DMF (80°C/ 1 saat karıştırma)	137,52±45,46



Şekil 8. a) %0,4'lük PPy konsantrasyonu ile üretilen elektroğirilmiş PAN nanomodifiyeli PGE elektrot yüzeyinden bir bölümün SEM görüntüsü b) Yalnızca PAN kullanılarak hazırlanan prekürsör çözeltiden (PPy=0) elektroğirme ile üretilen PAN nanomodifiyeli PGE elektrot yüzeyinden bir bölümün SEM görüntüsü

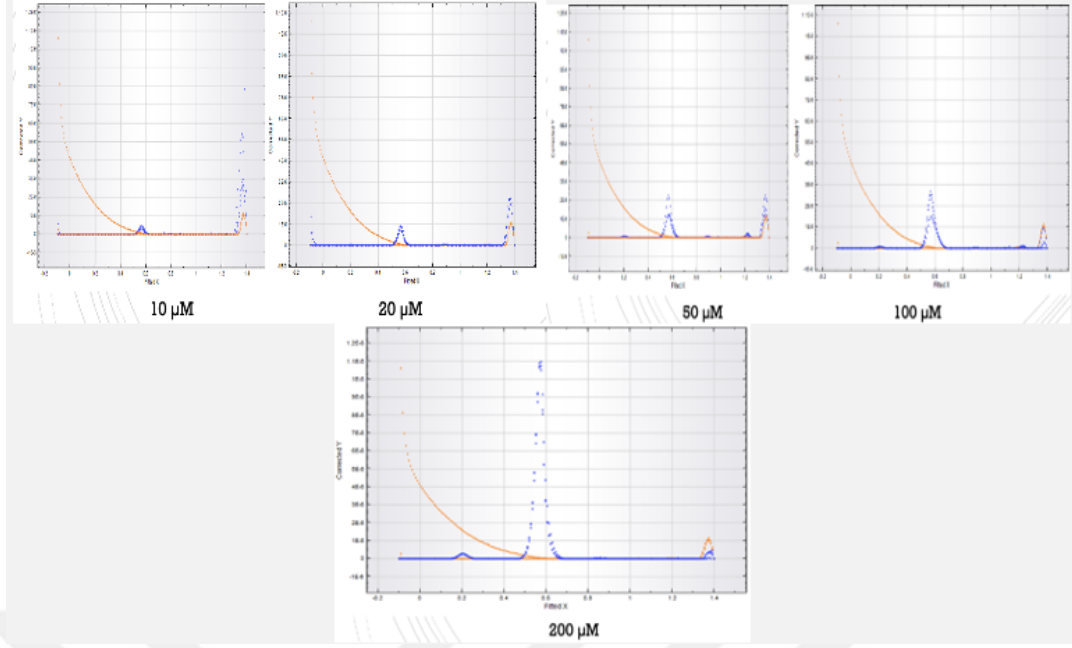
Elektrotlar üzerinden alınan lokal görüntülere (Şekil 8) ve Tablo 4'te verilen değerlere bakıldığında, PPy kullanımı ile daha ince yapılı ve çap varyasyonunun daha yüksek olduğu nanoliflerin elde edildiği (112,83±67,50 nm), öte yandan prekürsör çözelti formülasyonundan PPy çıkarılarak gerçekleştirilen uygulama ile elektrot yüzeylerinde PAN nanolif çapının arttığı (137,52±45,46 nm) görülmektedir. Bu sonuçlar, İnce-Yardımcı ve ark. (2022)'nin çalışmasında farklı PPy konsantrasyonları ile yapılan PAN nanolif üretimlerinden elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Dolayısıyla PPy varlığı ve miktarına bağlı olarak daha ince nanolifler elde edildiği veya başka bir ifadeyle PPy kullanılmaksızın daha kalın PAN nanoliflerin elde edildiği

görülmektedir. Ayrıca her iki uygulamada da düzgün yapılı ve boncuklanmanın gözlenmediği düzenli bir nanolif morfolojisine rastlanmaktadır. Literatürde yer alan ve yalnızca PAN içerikli prekürsör çözeltiyle nanolif üretimi gerçekleştirilen çalışmalara bakıldığında Gu ve ark. (2005)'nın prekürsör çözeltideki PAN konsantrasyonunu da içeren farklı elektrodeğirme parametreleri ile 200-1200 nm aralığında, Khan ve ark. (2015)'in ise 208-881 nm aralığında çaplara sahip nanolifler elde ettiği görülmekte ve tez çalışması kapsamında üretilen PAN nanoliflerin çok daha ince olduğu sonucuna varılmaktadır.

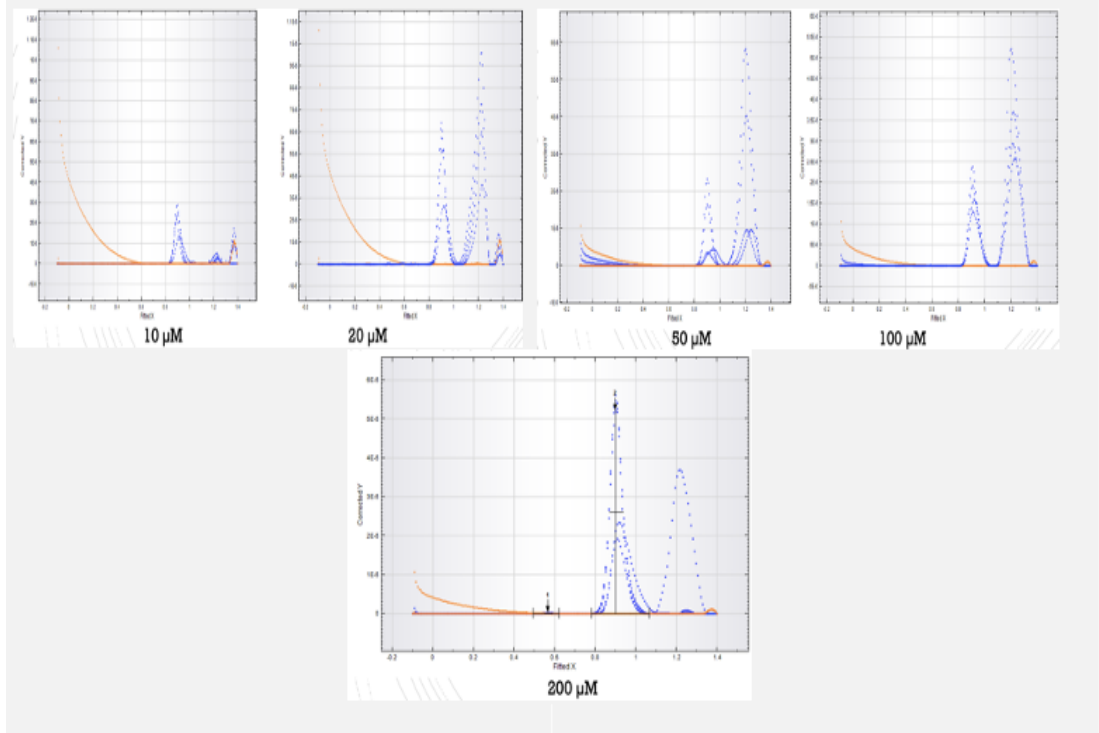
### **3.2. Modifiye Edilmemiş Kalem Ucu Elektrot (PGE) Sensör Yüzeyleri ile Elektrokimyasal Karakterizasyon Çalışması**

Bu kısımda, analitlerin elektrokimyasal karakterizasyonu için yalın PGE elektrotlar ile farklı konsantrasyonlardaki analit çözeltilerinde DPV ölçümleri alınmış ve pik potansiyelleri belirlenmiştir. PGE elektrotlar ile gerçekleştirilen ölçümler, analitlerin elektrokimyasal karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi ve pik potansiyellerinin belirlenmesine yönelik olarak yapılmıştır.

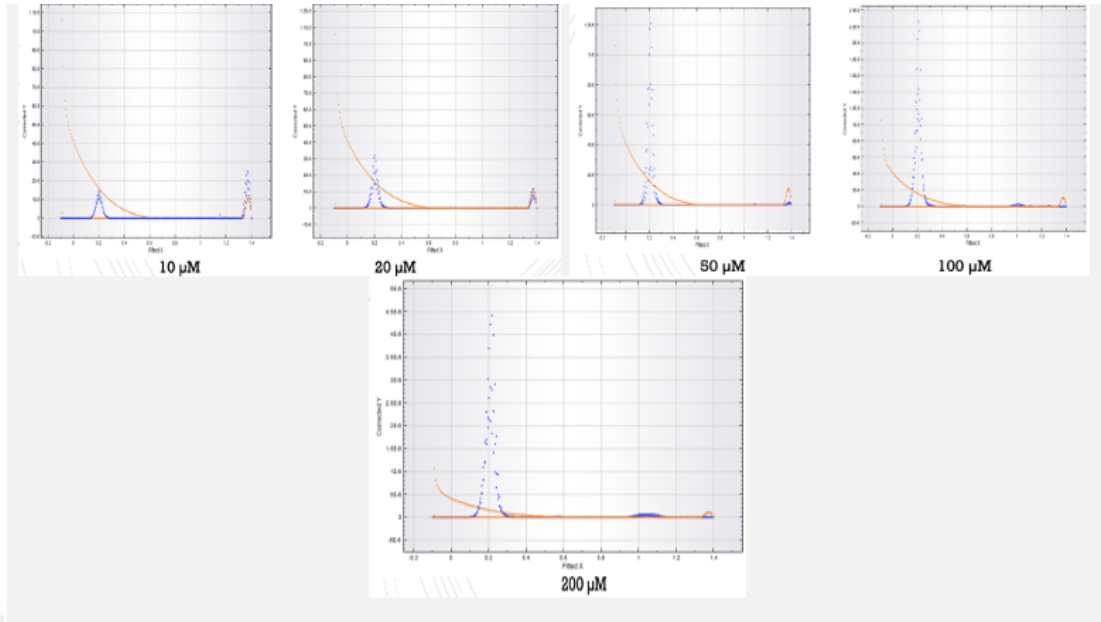
Analitlerin elektrokimyasal karakterizasyonlarına ait voltamogramlardan ve alınan ölçümlere göre spesifik voltajlarda yükselen akım piklerinden hareketle, analitlerin pik potansiyelleri belirlenmiştir. Voltamogramlar Şekil 9, Şekil 10 ve Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 9. Ksantinin 10, 20, 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramları



Şekil 10. Hipoksantin 10, 20, 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramları



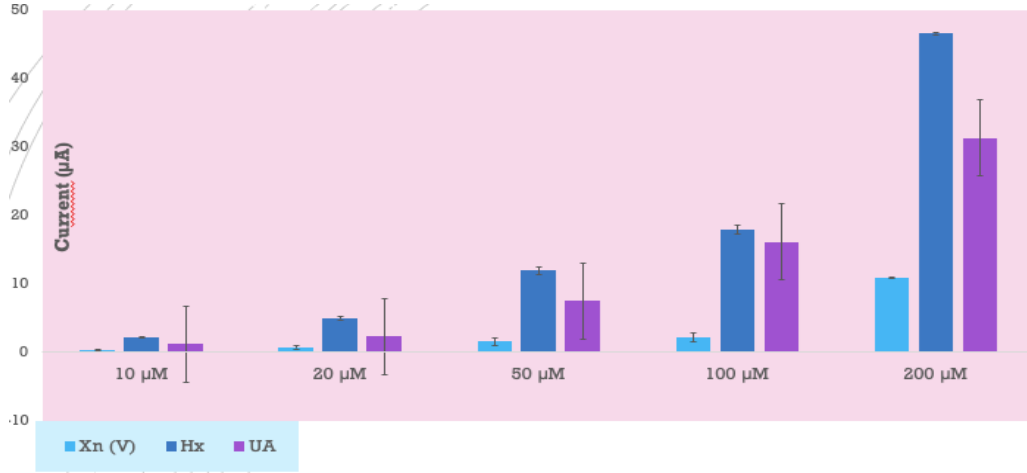
Şekil 11. Ürik asitin 10, 20, 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramları

Şekil 9, 10, ve 11'deki voltamogramlar, Hx'in 0,9 V'da, Xn'in 0,6 V'da ve UA'nın 0,2 V'da geldiğini göstermektedir. Zira artan konsantrasyona paralel olarak bu potansiyellerde gelen pik yükseklikleri artmaktadır. Bu çalışmalara ait ölçüm sonuçları Tablo 5'te, bu değerlerin grafiği ise Şekil 12'de yer almaktadır.

Tablo 5. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan analit çözeltileriyle alınan DPV ölçüm sonuçları ve analitlerin pik potansiyelleri

<b>Analitler/Pik Sinyali (mA)</b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>20 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>200 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Xn (0,6 V)</b>	0,39±0,07	0,69±0,26	1,56±0,52	2,22±0,59	10,87±0,10
<b>Hx (0,9 V)</b>	2,20±0,59	4,97±1,54	11,93±8,88	17,94±4,30	46,56±14,33
<b>UA (0,2 V)</b>	1,24±0,19	2,33±0,75	7,54±4,30	16,12±5,23	31,36±10,36

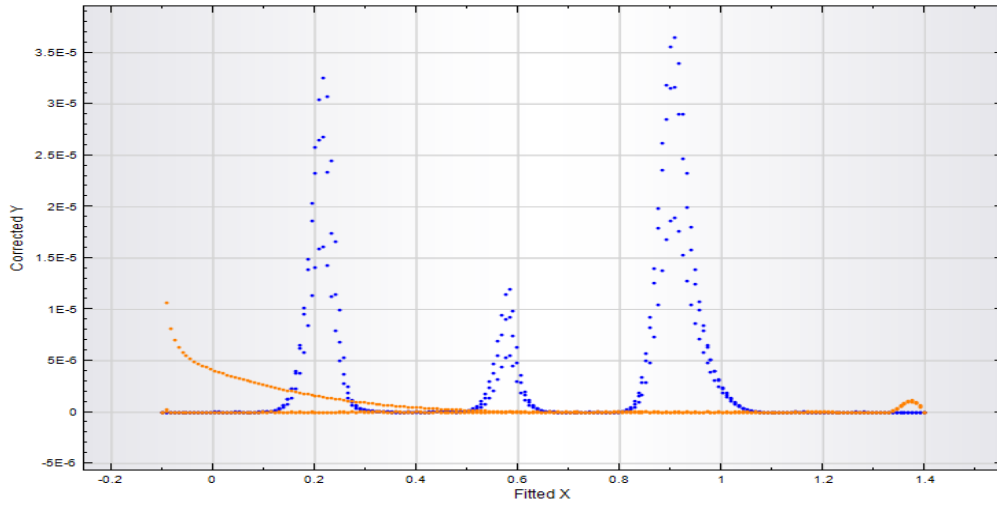
Sonuçlar, ortalama± standart sapma olarak verilmiştir (Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit)



Şekil 12. Xn, Hx, UA Konsantrasyon Çalışması ve Hata Çubukları

Tablo 5'teki ölçüm sonuçları ve Şekil 12'deki grafik incelendiğinde, artan konsantrasyonlarda ve ayrı ayrı hazırlanan saf analit çözeltileri ile alınan voltmetrik ölçüm sonuçlarının kendi içerisinde düzenli bir artış gösterdiği, hata çubuklarının ürik asitte daha büyük olduğu görülmektedir. Tablodaki değerler de, ürik aside ait okumaların Xn ve Hx'e göre daha yüksek standart sapmaya sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, bozunma ürünlerinden Hx ve Xn, bozulma reaksiyonları seyrinde daha önce açığa çıktığı için ölçüm hassasiyetinde daha öncelikli metabolitler olarak düşünülebilmektedir (Hernandez-Cazares ve ark., 2010).

Ayrıca, analitlerin eş zamanlı olarak tayin edilebilirliğiyle ilgili 200 µM'lık bir karışım (ksantin, hipoksantin ve ürik asit içeren) çözeltisi de hazırlanarak yeni bir ölçüm daha alınmıştır. Bu ölçüme ait voltamogram, Şekil 13'te verilmiştir.



Şekil 13. 200 µM'lık Hx, Xn ve UA karışımının voltamogramı

Karışım çözeltisinin Şekil 13'te yer alan voltamogramında da görüldüğü gibi tüm analitlerin (ksantin, hipoksantin ve ürik asit) eş zamanlı monitorizasyonu gerçekleşmiş, elde edilen düzgün ve net pikler ile karakterizasyon çalışması doğrulanmıştır.

Analitler ile girişim yapma potansiyeli olan DOP ve L-ASP'in de elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapılmış olup bu çalışmalara ait ölçüm sonuçları Tablo 6 ve Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 6. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan dopamin çözeltileriyle alınan DPV ölçüm sonuçları ve pik potansiyelleri

<b>DOP Pik Potansiyeli / Konsantrasyon (mA)</b>	<b>10 µM</b>	<b>20 µM</b>	<b>50 µM</b>	<b>100 µM</b>	<b>200 µM</b>
<b>(0,1 V)</b>	3,43±1,07	6,19±2,44	17,10±5,51	28,39±4,92	45,28±12,54
<b>(0,8 V)</b>	0,25±0,03	0,54±0,19	1,76±0,38	2,81±0,40	4,52±0,37

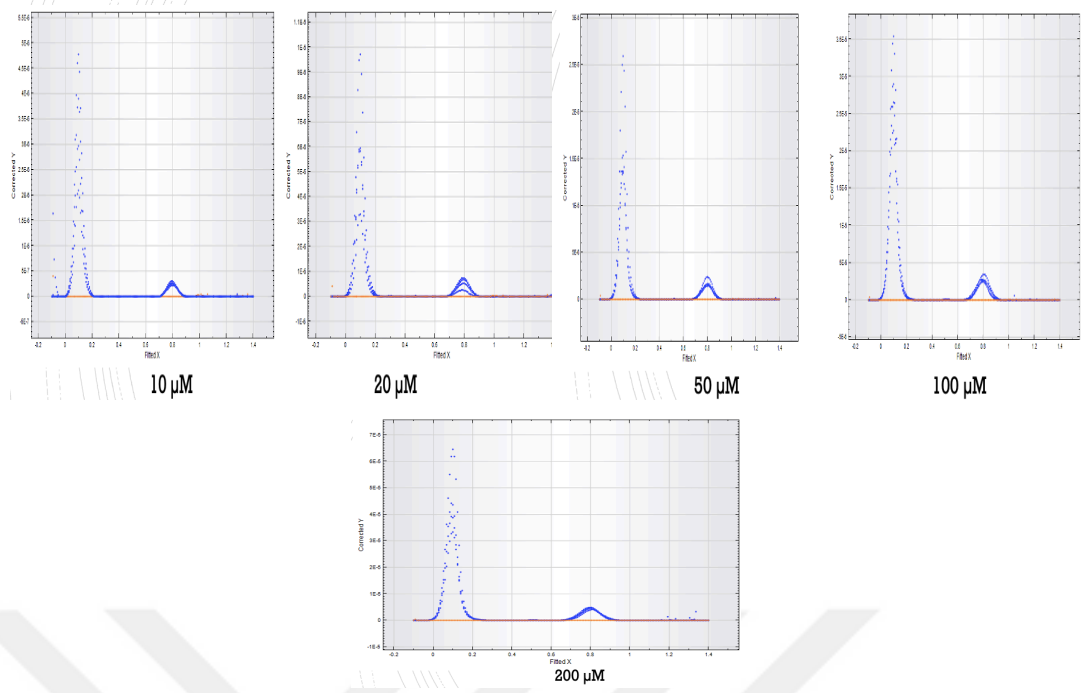
Sonuçlar, ortalama± standart sapma olarak verilmiştir (DOP: Dopamin)

Tablo 7. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan L-aspartik asit çözeltileriyle alınan DPV ölçüm sonuçları ve pik potansiyelleri

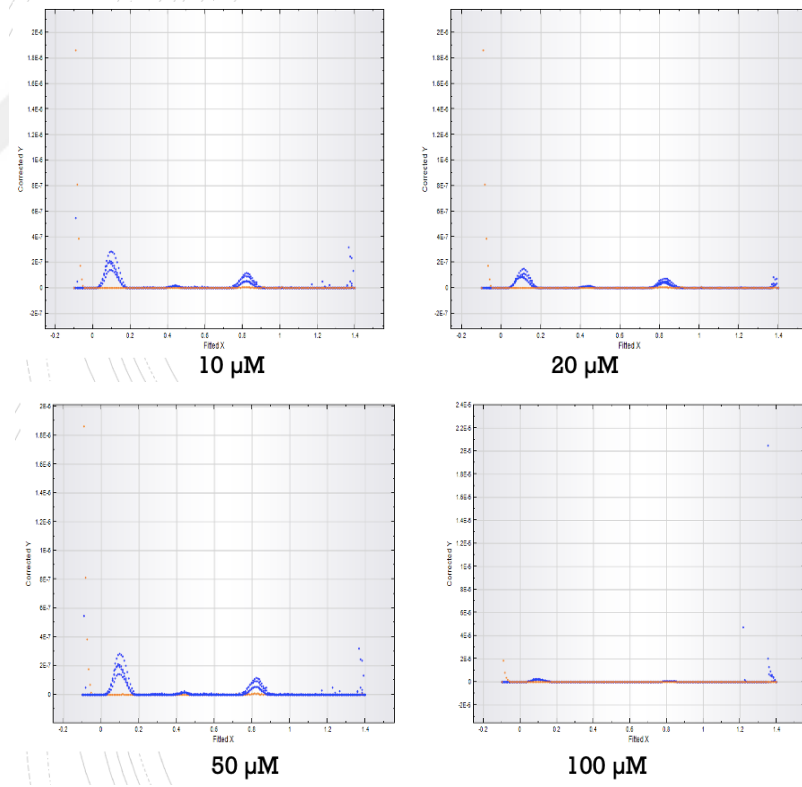
<b>L-ASP Pik Potansiyeli / Konsantrasyon (mA)</b>	<b>10 µM</b>	<b>20 µM</b>	<b>50 µM</b>	<b>100 µM</b>
<b>(0,1 V)</b>	96,22±35,80	107,73±27,51	209,10±54,38	227,10±19,57
<b>(0,8 V)</b>	73,72±7,82	56,69±14,23	78,41±28,66	78,47±7,97

Sonuçlar, ortalama± standart sapma olarak verilmiştir (L-ASP: Aspartik asit)

Tablo 6 ve Tablo 7’de görüldüğü gibi, DOP ve L-ASP’in pik potansiyelleri, analitlerin pik potansiyellerinden farklı olup 0,1 V ve 0,8 V’da pikleri gelmektedir. ASP ayrıca, yüksek konsantrasyonda (200 µM) tespit edilemeyerek lineer aralığın dışında kalmış ve bu nedenle ASP için 200 µM’lık ölçüm değerleri alınamamıştır. DOP ve L-ASP için tespit edilen pik potansiyellerinin gösterildiği voltamogramlar, Şekil 14 ve Şekil 15’te yer almaktadır.



Şekil 14. Dopaminin 10, 20, 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramlar

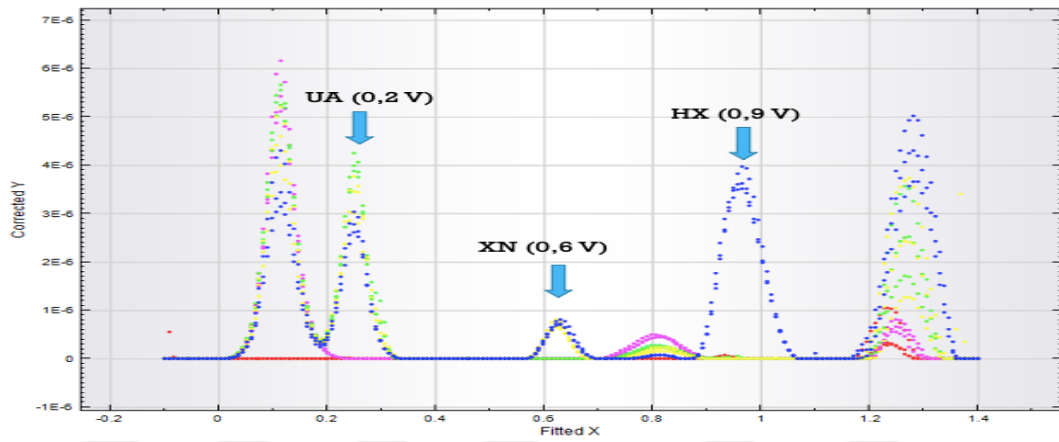


Şekil 15. L-Aspartik asitin 10, 20, 50 ve 100 $\mu\text{M}$ 'lık çözeltilerine ait voltamogramlar

Bu çalışmalara ilaveten, eklemeli konsantrasyon çalışması ile non-spesifik (girişim çalışması) ölçüm performansları da incelenmiştir. Söz konusu eklemeli

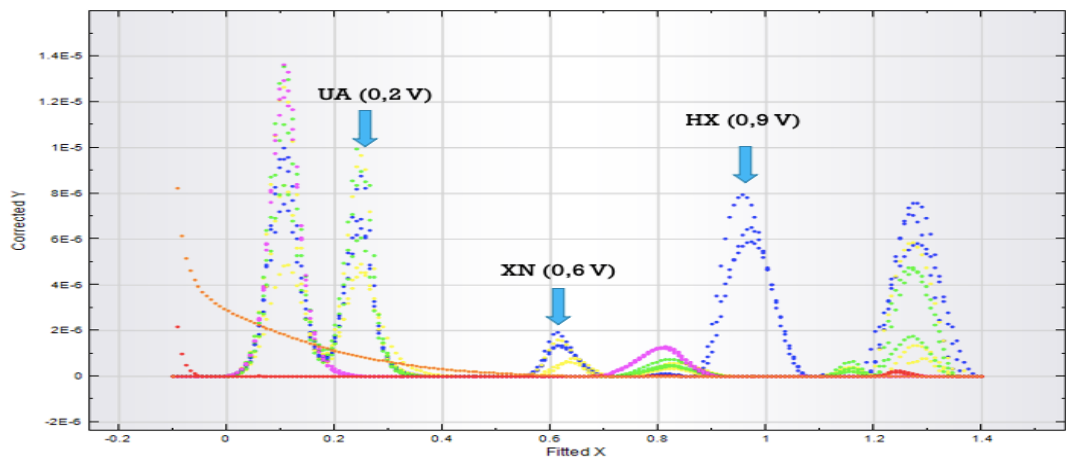
konsantrasyon çalışması için öncelikle L-ASP çözeltisi hazırlanarak ölçümler alınmış, sonra üzerine eş molarite sağlanacak şekilde sırası ile DOP, UA, Xn, ve Hx ilave edilerek ölçümler tekrarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (20, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ ) yapılan tekrarlar sonucunda L-ASP ve DOP pik potansiyellerinin analitler ile çakışmadığı ortaya konmuştur. Şekil-16, 17 ve 18’de sırasıyla 20, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  için yapılan eklemeli konsantrasyon çalışmasının voltamogramları verilmiştir.

1: ASP; 2: ASP+DOP; 3: ASP+DOP+UA; 4: ASP+DOP+UA+XN; 5: ASP+DOP+UA+XN+HX



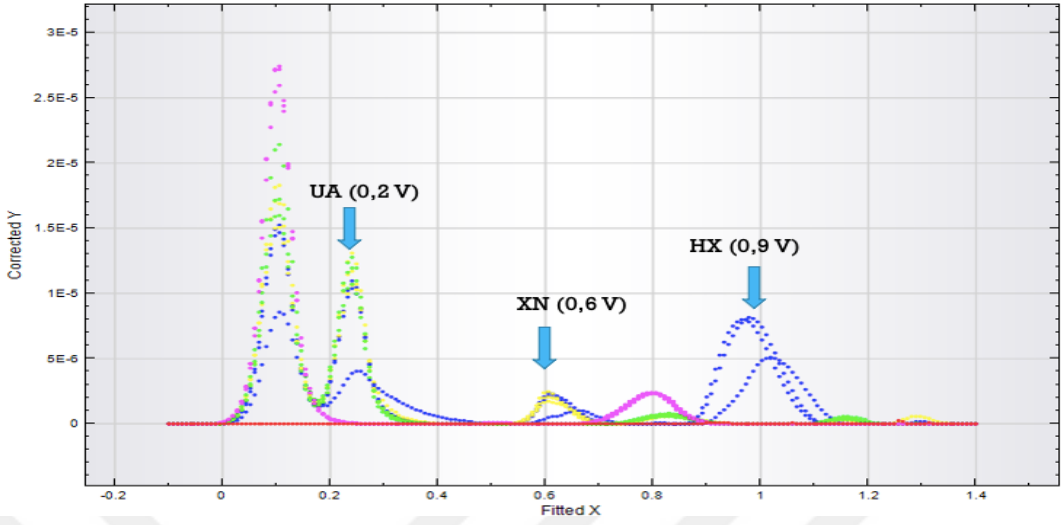
Şekil 16. 20  $\mu\text{M}$ 'lık eklemeli konsantrasyon çalışması voltamogramı (hazırlanan karışımlar ve voltamogramlar aynı renkler ile gösterilmiştir)

1: ASP; 2: ASP+DOP; 3: ASP+DOP+UA; 4: ASP+DOP+UA+XN; 5: ASP+DOP+UA+XN+HX



Şekil 17. 50  $\mu\text{M}$ 'lık eklemeli konsantrasyon çalışması voltamogramı (hazırlanan karışımlar ve voltamogramlar aynı renkler ile gösterilmiştir)

1: ASP; 2: ASP+DOP; 3: ASP+DOP+UA; 4: ASP+DOP+UA+XN; 5: ASP+DOP+UA+XN+HX



Şekil 18. 100  $\mu$ M'lık eklemeli konsantrasyon çalışması voltamogramı (hazırlanan karışımlar ve voltamogramlar aynı renkler ile gösterilmiştir)

Sonuçlar, literatür ile karşılaştırıldığında herhangi bir biyomolekül kullanılmaksızın, eşzamanlı ksantin, hipoksantin ve ürik asit ölçümlemeye yönelik olarak üretilen voltmetrik biyosensör örneklerinden Wen ve ark. (2017)'nin çalışmasında CMC (karboksimetil selüloz)-Pal (paligorskit)-NG (nano katmanlı azot içeren grafen)/GCE (camsı karbon elektrot) içerikli nanokompozit elektrot kullanılmak suretiyle 0,1 M PBS'te (pH=7) hazırlanan analit çözeltileri ile yapılan ölçümlerin sonucunda pik potansiyelleri UA için yaklaşık 0,3 V; Xn için yaklaşık 0,7 V ve Hx için yaklaşık 1 V olarak kaydedilmiştir. Benzer şekilde Zhang ve ark. (2019), GCE üzeri platin nanopartikül yüklü metal organik yapıli elektrot tasarımı ile 0,1 M PBS (pH=7)'te eşzamanlı ksantin, hipoksantin, ürik asit ve dopamin tayini gerçekleştirmiş ve pik potansiyellerini dopamin için 0,13 V; ürk asit için 0,28 V; ksantin için 0,68 V ve hipoksantin için 1,05 V şeklinde saptamıştır. Bu sonuçların, yalın PGE elektrotlar ile elde edilen sonuçlara (pik potansiyelleri) yakın olduğu görülmüştür.

### 3.3. Elektroğirilmiş PAN Nanomodifikasyonu Uygulanan PGE Sensör Yüzeylerinin Elektrokimyasal Performansının Değerlendirilmesi

Elektroğirilmiş PAN nanomodifikasyonu ile elde edilen elektrotların ölçüm performansı ise Tablo 8, Tablo 9 ve Tablo 10'da verilmiş olup bu tablolardaki değerlere göre çizilen grafikler, elektrotların ksantin, hipoksantin ve ürik asit ölçüm performansları, hata çubukları ve  $R^2$  değerleri ile beraber Şekil 19, 20 ve 21'de verilmiştir.

Tablo 8. PPy kullanılmaksızın (Yalnızca % 8 PAN çözeltisi) yapılan elektroğirilmiş nanolif modifiyeli elektrot üretimi sonrası analitlerin DPV ölçümlerinden elde edilen ortalama pik yükseklikleri

Konsantrasyon/Pik yük. (nano amper)	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	200 $\mu$ M
Xn	25,16 $\pm$ 10,87	51,28 $\pm$ 9,76	109,12 $\pm$ 22,73	190,56 $\pm$ 38,59	416,24 $\pm$ 40,25
Hx	101,95 $\pm$ 6 1,07	140,53 $\pm$ 22,85	419,90 $\pm$ 50,53	644,48 $\pm$ 108,48	1130,52 $\pm$ 156,18
UA	94,70 $\pm$ 24,68	208,17 $\pm$ 55,92	817,71 $\pm$ 286,28	1426,33 $\pm$ 527,41	1650,83 $\pm$ 447,80

Sonuçlar, ortalama $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir

(Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit; PPy: Polipirol; PAN: Poliakrilonitril)

Tablo 9. % 0,4 PPy içeren % 8'lik PAN çözeltisi ile yapılan elektroğirilmiş nanolif modifiyeli elektrot üretimi sonrası analitlerin DPV ölçümlerinden elde edilen ortalama pik yükseklikleri

Konsantrasyon/Pik yük. (nano amper)	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	200 $\mu$ M
Xn	14,51 $\pm$ 0,74	53,65 $\pm$ 8,53	86,40 $\pm$ 52,92	161,18 $\pm$ 62,34	264,77 $\pm$ 103,52
Hx	53,99 $\pm$ 9,71	173,39 $\pm$ 44,33	285,33 $\pm$ 35,13	559,71 $\pm$ 172,44	956,26 $\pm$ 283,94
UA	81,58 $\pm$ 0,38	342,97 $\pm$ 260,48	722,53 $\pm$ 348,24	934,68 $\pm$ 221,62	2129,15 $\pm$ 980,31

Sonuçlar, ortalama $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir

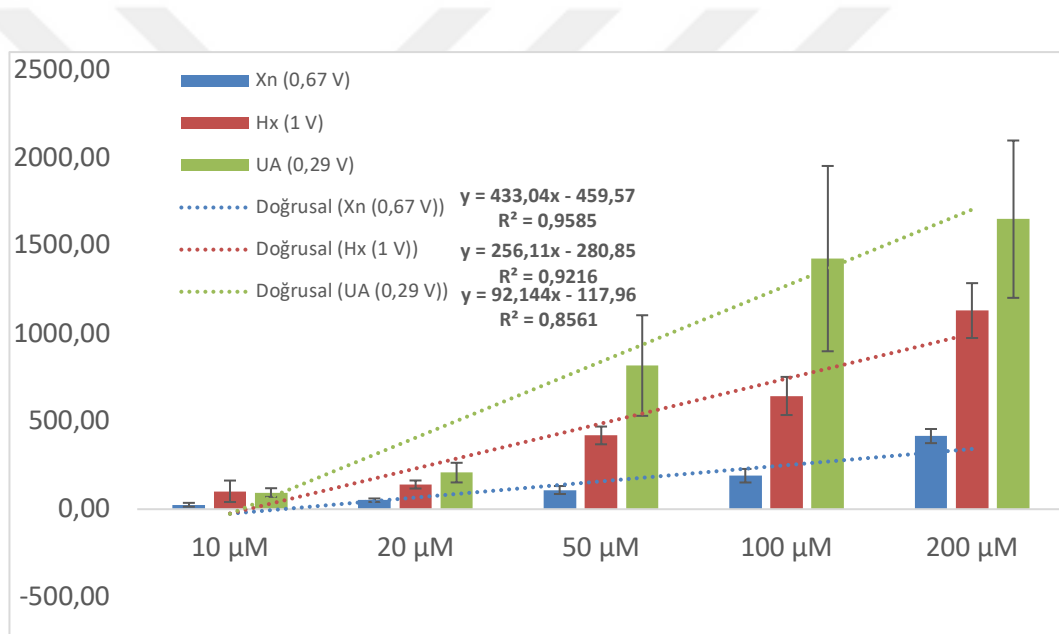
(Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit; PPy: Polipirol; PAN: Poliakrilonitril)

Tablo 10. % 0,8 PPy içeren % 8'lik PAN çözeltisi ile yapılan elektroğirilmiş nanolif modifiyeli elektrot üretimi sonrası analitlerin DPV ölçümlerinden elde edilen ortalama pik yükseklikleri

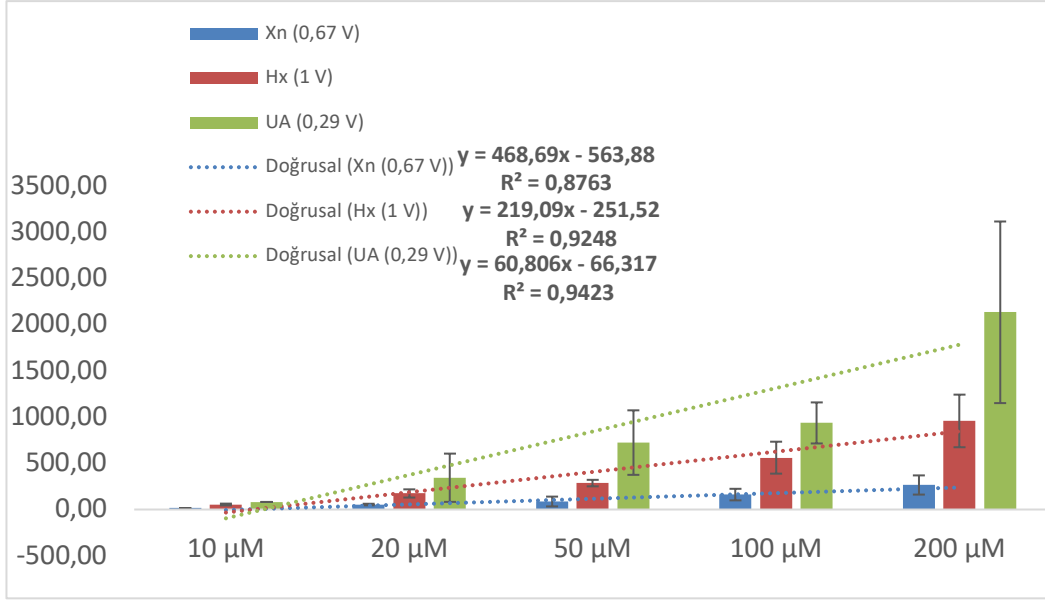
Konsantrasyon/Pik yük. (nano amper)	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	200 $\mu$ M
Xn	24,00 $\pm$ 3,28	26,89 $\pm$ 11,14	53,04 $\pm$ 19,81	112,06 $\pm$ 21,69	236,32 $\pm$ 35,71
Hx	74,89 $\pm$ 26,82	129,85 $\pm$ 71,42	300,25 $\pm$ 110,75	791,76 $\pm$ 160,58	1285,50 $\pm$ 207,01
UA	100,79 $\pm$ 28,37	165,66 $\pm$ 23,19	420,64 $\pm$ 151,05	516,68 $\pm$ 333,69	1124,35 $\pm$ 952,46

Sonuçlar, ortalama $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir

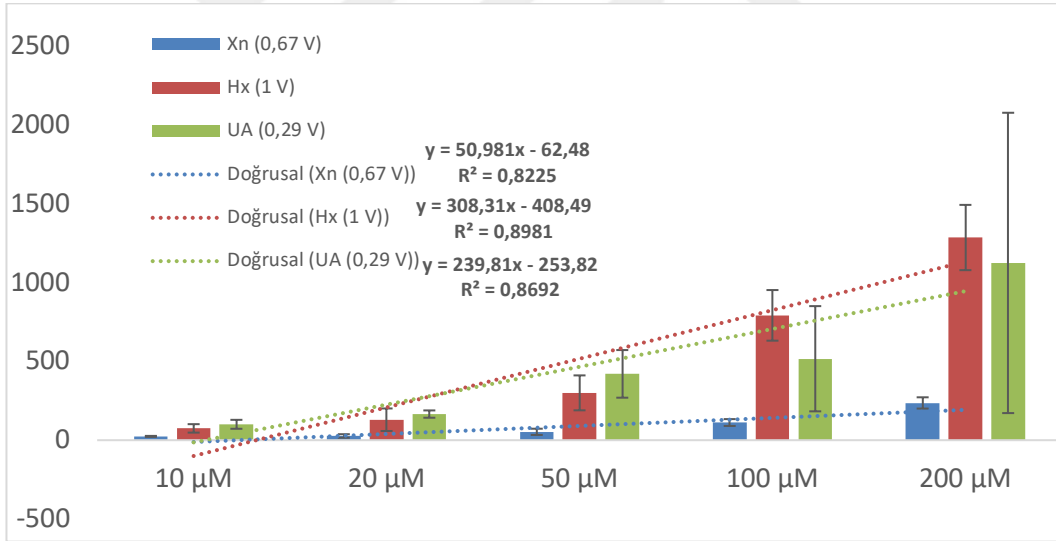
(Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit PPy: Polipirol; PAN: Poliakrilonitril)



Şekil 19. PPy kullanılmaksızın (Yalnızca % 8 PAN çözeltisi) hazırlanan çözeltiden elektroğirme ile elde edilen elektrotların Hx, Xn ve UA ölçüm performansları, hata çubukları ve R<sup>2</sup> değerleri



Şekil 20. % 0,4 PPy içeren % 8'lik PAN çözeltisinden elektrodeleme ile elde edilen elektrotların Hx, Xn ve UA ölçüm performansları, hata çubukları ve  $R^2$  değerleri



Şekil 21. % 0,8 PPy içeren % 8'lik PAN çözeltisinden elektrodeleme ile elde edilen elektrotların Hx, Xn ve UA ölçüm performansları, hata çubukları ve  $R^2$  değerleri

Tablo 8, 9 ve 10'daki verilere göre çizilen Şekil 19, 20 ve 21'deki grafiklere bakıldığında, analitlerin DPV ölçüm sonuçlarının hata çubukları ve  $R^2$  değerleri ile beraber incelenmesi sonucu, PPy konsantrasyonunun % 0,8 olduğu uygulamada performansın nispeten daha düşük olduğu ve  $R^2$  değerlerinin de 0,9'un altında kaldığı, diğer 2 üretimde ise  $R^2$ 'lerin yükseldiği ve fakat ortalama pik yükseklikleri

bakımından PPy kullanılmayan üretim ile en iyi sonuçların alındığı anlaşılmaktadır. Başka bir deyişle, genel pik yüksekliklerine ve  $R^2$  değerlerine göre polimer çözelti formülasyonundan polipirolün çıkarıldığı bir üretim ile daha yüksek performansa sahip, özgün bir elektrot tasarımı gerçekleştirilebilmektedir. Dolayısıyla İnce-Yardımcı (2022)'nin çalışmasında, artan PPy konsantrasyonunun iletkenliği artırmak suretiyle sensör özelliklerini iyileştirdiği ifadesinden farklı olarak, PPy kullanımının bu çalışma kapsamında ölçüm performansını iyileştirmediği sonucuna varılmaktadır. Ayrıca çözünmesi zor olan ve uzun süren PPy kullanımının, biyosensör üretimine hazırlık sürecini uzatmasından kaynaklı (1 haftalık ısıtma & karıştırma süreci) dezavantajın giderilmesi ve olası bir aksaklık halinde karşılaşılabilecek zaman kaybının önlenmesi, bu sayede biyosensör elektrotlarının ticari boyuta adaptasyonunu kolaylaştırabilecek olması da birer kazanım olarak yorumlanabilir. Nitekim, çeşitli amaçlarla elektroğirilmiş PAN nanolif üretimlerine yönelik literatür çalışma örneklerine de rastlanmakta ve PPy kullanımının bu tez çalışmasında performansı olumlu etkilemediği anlaşılmaktadır. Literatürde de çeşitli amaçlarla yalnız PAN+DMF çözeltisi ile üretilen nanolif üretimlerinin varlığı (Gu ve ark., 2005; He ve ark., 2008; Khan ve ark., 2015; Isaac ve ark., 2020; Huang ve ark. 2022) da dikkat çekmekle beraber, bu tez çalışmasının balığın tazelik kriterlerinden olan ksantin, hipoksantin ve ürik asidin belirlenmesine yönelik olarak elektroğirilmiş PAN nanoliflerin kalem ucu elektrotların yüzey modifikasyonunda kullanılmasına dayalı tek tasarım olması, çalışmanın özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar itibariyle PAN/PPy prekürsör çözeltisinin Taylor konisi biçiminde kararlı ve düzenli bir akış sağlayarak elektrotların üzerine kaplanması hedefiyle elektrot tasarımı için en uygun olan üretim parametreleri 18 kV uygulama voltajı, 5  $\mu$ L/dk debi, 13 cm uygulama mesafesi, 150 rpm kolektör dönüş hızı ve 2 saatlik uygulama süresi olarak belirlenmiştir (Şekil-3).

### **3.4. PAN Nanomodifikasyonu Uygulanan PGE Yüzeylerin Seçiciliği**

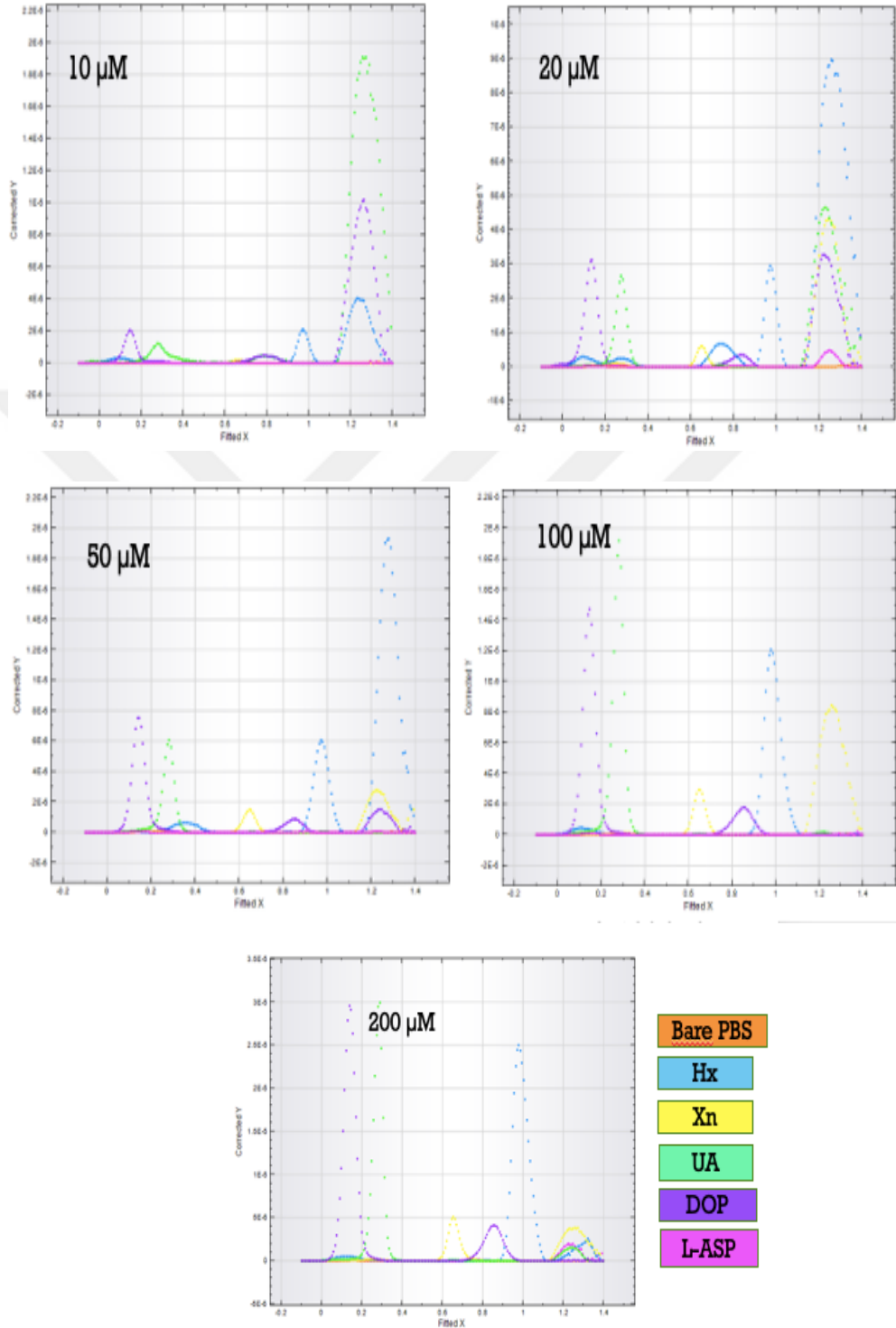
Elektroğirilmiş PAN nanolifler ile modifiye edilen aktif PGE yüzeylerin yalnızca analitler ile etkileşim göstermesi, bir başka deyişle performansın tam olarak değerlendirilmesinde bu sensör elektrotlarının seçiciliği aynı derecede öneme sahip bulunmaktadır. Analitler ile girişim yapabilecek olan maddelerden dopamin ve L-

aspartik asitin elektrokimyasal karakterizasyonu ve analitleri tayin etmedeki seçiciliğinin tespitine yönelik çalışmalar kapsamında beş ayrı konsantrasyonda analitlerin (Hx, Xn, UA) yanı sıra DOP ve L-ASP çözeltilerinin DPV ölçümleri alınmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarını içeren veriler Tablo-11’de, voltamogramları ise Şekil 22’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ksantin, hipoksantin ve ürik asit ile girişim potansiyeli olan dopamin ve L-aspartik asit çözeltilerinden alınan DPV ölçüm sonuçları ve pik potansiyelleri

Maddeler / Derişim / Ölçüm (mA)	10 µM	20 µM	50 µM	100 µM	200 µM
<b>Hx (1 V)</b>	2089,63± 146,31	2856,20± 502,45	6550,30± 817,59	14414± 4628,60	27915,33± 5619,75
<b>Xn (0,7 V)</b>	196,42±33,58	525,80± 64,48	1137,81± 323,11	2928,03± 507,50	4445,97 ±794,34
<b>UA (0,3 V)</b>	1013,55± 213,52	2084,35± 627,41	5479,95± 671,63	15980,33± 3638,52±	30780,33± 4871,76
<b>DOP (0,15 V)</b>	1657,9± 262,31	3199,37± 117,48	6986,10± 1274,87	15381,33± 1796,51	27785,33± 1595,24
<b>DOP (0,8 V)</b>	377,66±52,13	318,25± 31,25	973,77± 95,24	1903,43± 107,83	4267,7± 451,13
<b>L-ASP (0,15 V)</b>	14,97± 3,25	21,55± 17,01	26,75± 27,02	32,49± 15,15	51,31±37,00
<b>L-ASP (0,8 V)</b>	22,43± 31,13	168,40± 237,14	8,47± 6,95	4,92±5,16	64,57±67,53

Sonuçlar, ortalama± standart sapma olarak verilmiştir (Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin; UA: Ürik asit; DOP: Dopamin; L-ASP: L-aspartik asit)



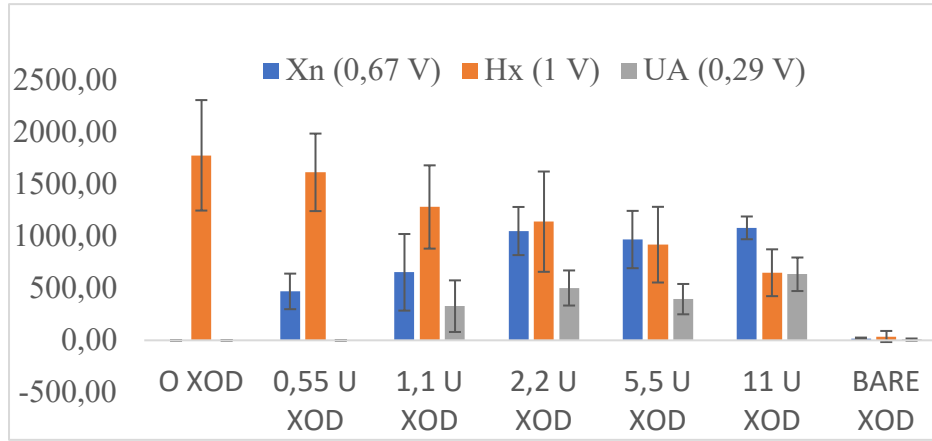
Şekil 22. Hx, Xn, UA ve girişim potansiyeli olan DOP ve L-ASP'in 10, 20, 50, 100 ve 200 µM'lık karışım çözeltilerinin voltamogramı

Tablo 11'deki veriler ve Şekil 22'deki voltamogramlara göre, numune (balık) matriksinde bulunan ve analitler ile girişim potansiyeli olan DOP ve L-ASP, tasarlanan elektrotlar kullanılarak seçici biçimde analiz edilebilmektedir. Piklerin çakışmaması ve böylelikle maddelerin karışım çözeltisindeki varlığının tespit edilebilmesinin yanı sıra, her bir maddenin artan konsantrasyonlardaki varlığına karşılık pik yüksekliklerinin de artması, maddelerin birbirini baskılamadan eş zamanlı olarak algılanabildiği özgün ve seçici bir sensör yüzeyi elde edildiğini göstermektedir. Sonuçlar, yalnız PGE ile tespit edilen pik potansiyelleri ile ilgili olarak yapılan literatür karşılaştırmalarına uymakta (Wen ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2019) olup PAN nanomodifikasyonu gerçekleştirilen elektrotlar ile 0,05-0,1 V civarında farklılık gözlenmektedir. Bu da, elektrotların yüzey farklılığı ve pH gibi nedenlerden ileri gelmektedir.

### **3.5. Kontrollü Bozunma**

#### **3.5.1. Farklı Konsantrasyonlarda Enzim (XOD) Uygulamasıyla Kontrollü Bozunma**

Konsantrasyon çalışmasının planlanmasında, Avan ve ark. (2023)'nın balıktaki hipoksantin miktarının enzimatik olarak belirlenmesine yönelik CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) kolorimetrik sensör çalışması temel alınmış ve kullanılacak enzim miktarı belirlenmiştir. Buna göre, enzim katalizörlüğünde Şekil 23'te görüldüğü gibi hipoksantin giderek azalan konsantrasyonlardaki seyrine karşılık artan konsantrasyonlarda ksantin ve ürik asitin eş zamanlı elektrokimyasal monitorizasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 23. Farklı konsantrasyonda XOD enzimi ile muamele edilen Hx çözeltisinin DPV ölçüm sonuçları

Alınan ölçüm sonuçları, Tablo 12’de ortalama pik yükseklikleri (nano amper: nA) ± standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir.

Tablo 12. Farklı konsantrasyonda ksantin oksidaz enzimi ile muamele edilen hipoksantin çözeltisinin DPV ölçüm sonuçları

Enzim Konsantrasyonu / Akım pikleri (nA)	Hx	Xn	UA
<b>0 XOD</b>	1779,98±531,46	0	0
<b>0,55 U XOD</b>	1616,20±372,92	470,71±171,10	0
<b>1,1 U XOD</b>	1282,90±400,59	654,37±368,48	328,58±248,27
<b>2,2 U XOD</b>	1141,69±482,46	1051,52±231,62	503,54±168,79
<b>5,5 U XOD</b>	920,34±364,08	969,71±275,75	396,29±145,91
<b>11 U XOD</b>	650,26±225,28	1082,03±109,51	635,50±161,30
<b>BARE XOD</b>	36,81±53,45	18,44±7,95	7,12±10,40

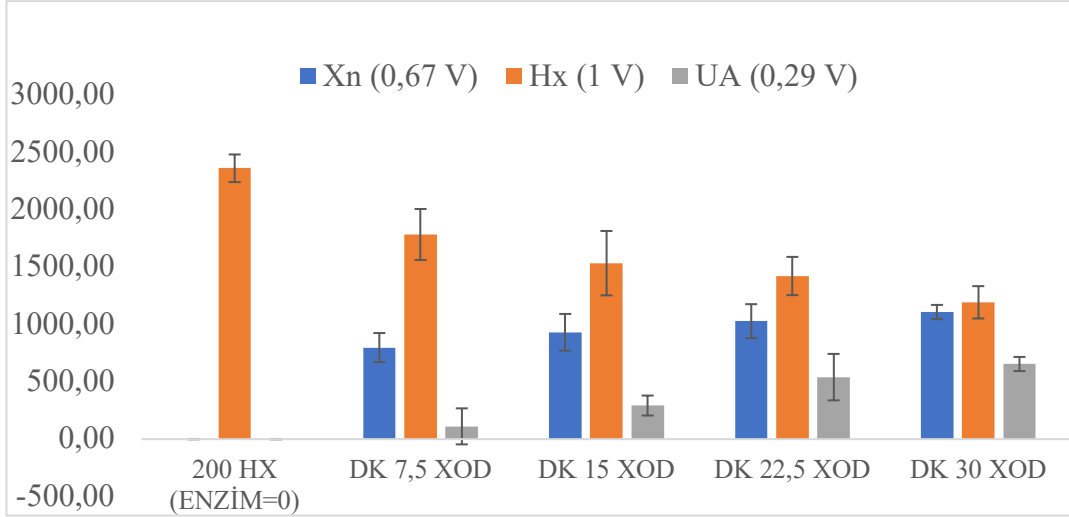
Sonuçlar, ortalama± standart sapma olarak verilmiştir

(Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit; XOD: ksantin oksidaz)

Tablo 12’de, arklı konsantrasyonda XOD enzimi ile muamele edilen Hx çözültisinin DPV ölçümlerinden elde edilen pik yüksekliklerine ait değerler görülmektedir. Bu değerlerden yararlanılarak oluşturulan Şekil 23’te de görüldüğü gibi sabit sürede (15 dk.) artan enzim konsantrasyonuna karşılık Hx sinyalleri azalmakta ve Xn ile UA sinyalleri ise artmaktadır. Bu da, balık dokularındaki XOD enzimi ile gerçekleşecek olan dönüşümlerin elektrokimyasal olarak eş zamanlı görüntülenebileceğini göstermektedir. Ne var ki ürik asit sinyallerinde düzenli bir artış olmaması, Radi ve ark. (1992)’nın belirttiği şekilde ürik asidin ksantin oksidaz enzimi üzerindeki yarışmasız inhibisyon etkisine bağlı olarak mevcut ürik asit miktarının sonuçlara tam olarak yansımamasıyla açıklanmaktadır. Bir hücre içerisinde metabolik yol izlerinde kullanılan enzim sentezinin kontrolü, geri tepkimeli regülasyon ile gerçekleştirilmektedir. Bir başka deyişle ürik asit, ksantin oksidaz enzimine aktif bölge dışındaki bir bölgeden bağlandığı için tespit edilen miktar, gerçek ürik asit miktarı olmamaktadır. Bu sonuçlardan hareketle, her üç analit pikinin de gözlenebilmeye başladığı 1,1 U’luk ksantin oksidaz konsantrasyonu seçilerek farklı sürelerde ksantin oksidaz enzimi uygulamasıyla kontrollü bozunma gerçekleştirilmiştir.

### **3.5.2. Farklı Süre Enzim (XOD) Uygulamasıyla Kontrollü Bozunma**

1,1 U’luk ksantin oksidaz enzimi ile farklı sürelerde muamele edilen hipoksantin çözültisi ile yapılan çalışmaya ait DPV ölçüm sonuçları, Şekil 24’te yer almıştır. Şekildeki grafikte görüldüğü gibi hipoksantin giderek azalan konsantrasyonlardaki seyrine karşılık artan konsantrasyonlarda ksantin ve ürik asitin eş zamanlı elektrokimyasal monitorizasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 24. 1,1 U'luk XOD enzimi ile farklı sürelerde muamele edilen Hx çözeltisinin DPV ölçüm sonuçları

Alınan ölçüm sonuçları, Tablo 13'te ortalama pik yükseklikleri (nano amper: nA)  $\pm$  standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir.

Tablo 13. 1,1 U'luk XOD enzimi ile farklı sürelerde muamele edilen Hx çözeltisinin DPV ölçüm sonuçları

Enzim Uygulama Süresi / Akım pikleri (nA)	Hx	Xn	UA
200 $\mu$ M Hx (ENZİM=0)	2357,80±120,21	0	0
XOD DK 7,5	1781,40±221,72	797,35±126,23	111,22±156,83
XOD DK 15	1531,60±280,22	930,33±159,51	292,54±86,97
XOD DK 22,5	1419,80±166,56	1026,72±148,13	539,75±202,07
XOD DK 30	1191,00±140,83	1106,80±61,46	654,06±61,56

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir (Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit)

Tablo 13'te, sabit konsantrasyonda (1,1 U) farklı sürelerde ksantin oksidaz enzimi ile muamele edilen hipoksantin çözeltisinin DPV ölçümlerinden elde edilen pik yüksekliklerine ait değerler görülmektedir. Bu değerlerden yararlanılarak oluşturulan Şekil 24'te de görüldüğü gibi uygulama süresi arttıkça bozunma ilerlediği için hipoksantin sinyalleri azalmakta ve ksantin ile ürik asit sinyalleri ise artmaktadır. Böylelikle balığın ölümünü izleyen süreçte dokulardaki ksantin oksidaz enzimine bağlı olarak analit konsantrasyon değişikliklerinin izlenebileceği ortaya konmuştur. Nitekim Xia ve Zweier (1995) tarafından iskemik kalp dokularında (yetersiz kan akışına ve oksijensiz kalmaya bağlı plaklaşma) ksantin oksidaz aktivitesine bağlı serbest radikal oluşumunun incelendiği çalışmada ATP yıkımına bağlı olarak oluşan ksantin ve hipoksantin substratlarının konsantrasyonunda da büyük bir artış olduğuna ve beraberinde moleküler oksijenin hidrojen perokside indirgendiğine, sonrasında ise çok daha reaktif serbest radikallerin de açığa çıkması nedeniyle substrat kontrolünün önemine dikkat çekilmiştir. Benzer şekilde Sekizuka (2022) tarafından, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde ksantin oksidaz inhibitörlerinin ve böylece ürik asit oluşumunun önlenmesindeki önem vurgulanmıştır.

### **3.6. Tamponda Tespit Limiti (LOD) ve Miktersal Tayin Limiti (LOQ)**

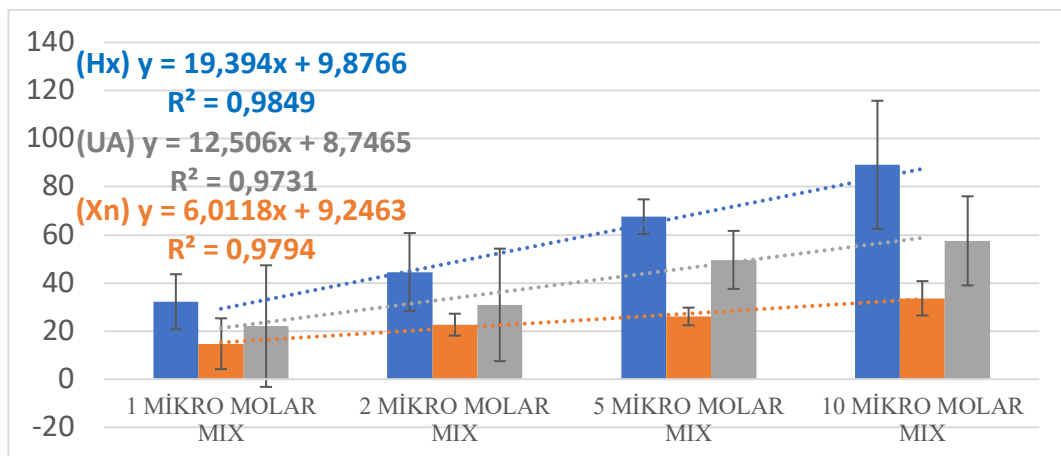
LOD ve LOQ belirlemek amacıyla 1, 2, 5 ve 10  $\mu\text{M}$ 'lık hazırlanan ksantin, hipoksantin ve ürik asit karışım çözeltileri, elektroğirilmiş PAN nanomodifiyeli elektrotlar ile DPV ölçümlerine tabi tutulmuş ve Tablo 14'teki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 14. Analitlerin farklı konsantrasyonlardaki (1, 2, 5 ve 10 µM) karışım çözeltilerinin DPV ölçüm sonuçları ve standart sapmaları

Konsantrasyon/ Akım pikleri (nA)	Hx	Xn	UA
1 µM mix	31,19±11,44	14,73±10,57	22,06±25,28
2 µM mix	44,53±16,23	22,67±4,55	30,88±23,39
5 µM mix	67,57±7,20	26,08±3,66	49,6±12,06
10 µM mix	89,16±26,61	33,63±7,14	57,51±18,53
Blank (Ort.)	7,05	0	4,80

Sonuçlar, ortalama± standart sapma olarak verilmiştir (Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit)

Bu sonuçlara göre blank (kör) ile yani analitleri içermeyen 0,05 M'lık (pH=7) fosfat tamponu ile alınan ölçümlerde ksantin sinyali alınmaz iken diğer analitlerden çok düşük sinyaller alınmış ve tüm konsantrasyonlarda en yüksek sinyali veren analit hipoksantin olmuştur. Bu ölçüm sinyallerine göre çizilen grafik ise Şekil 25'teki gibidir.



Şekil 25. Analitlerin 1, 2, 5 ve 10 µM'lık karışım çözeltileriyle elde edilen DPV ölçüm sonuçları

Şekil 24'teki grafiğe göre ölçüm sonuçlarının  $R^2$  değerleri, hipoksantin için 0,98, ksantin ve ürik asit için 0,97 olarak bulunarak regresyon model uyumunun yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca Tablo 14'teki veriler ile Şekil 25'teki doğru denklemleri kullanılarak hesaplanan LOD ve LOQ değerleri, Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. Hx, Xn ve UA için LOD ve LOQ değerleri ( $\mu\text{M}$ )

<b>Analitler</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
<b>Hx</b>	0,74	2,49
<b>Xn</b>	1,28	4,28
<b>UA</b>	1,32	4,42

Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit

Tablo 15'te görüldüğü gibi, LOD ve LOQ değerleri Hx için sırasıyla 0,74  $\mu\text{M}$  ve 2,49  $\mu\text{M}$ , Xn için 1,28  $\mu\text{M}$  ve 4,28  $\mu\text{M}$ , UA için ise 1,32  $\mu\text{M}$  ve 4,42  $\mu\text{M}$ 'dir. Bu durumda, sensörün gerçek (balık) örneklerde uygulanmasıyla elde edilecek olan akım pik değerleri, her bir analit için ilgili doğru denklemlerinde “y” yerine yazılarak konsantrasyon karşılığının bulunmasıyla sonuç verecek özgün bir sensör yüzeyi oluşturulmuştur. Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen ve satılan balık numunelerindeki bozulma eşik değerlerinin de belirlenmesiyle ürünün kabul edilebilirliği ile ilgili hızlı ve pratik bir karar mekanizması olarak bu sensör yüzeylerinden yararlanılması mümkün görülmektedir.

Literatür özetinde derlenmiş olan (Bölüm 1.5) Tablo 1'de yer alan elektrokimyasal biyosensör çalışmaları incelendiğinde, Hu ve ark. (2000) tarafından geliştirilen ve enzim (XOD) kullanımına rağmen 0,8  $\mu\text{M}$ 'lık LOD değerine sahip olan elektrokimyasal hipoksantin biyosensöründen daha hassas bir LOD değerine ulaşıldığı görülmektedir. XOD enzimi kullanılan diğer çalışmalardan Lawal ve Adeloju (2010), polipirol-platin elektrot bazlı tasarımında 6  $\mu\text{M}$ , Görgülü ve ark. (2013) XOD ile birlikte ürikaz, polipirolpilivinil sülfonat bazlı platin elektrod tasarımıyla 2,5  $\mu\text{M}$ , Torres ve ark. (2013) karbon film bazlı elektrot ile 0,77  $\mu\text{M}$ , karbon film ve karbon nanotüp modifiyeli elektrot tasarımı biyosensörü ile 0,75  $\mu\text{M}$ , Albeda ve ark. (2017) nafyon, titanyum dioksit grafen bazlı camsı karbon elektrot ile 9,5  $\mu\text{M}$ , Si ve ark. (2018) pozitif yüklü polidimetil amonyum-karbon nanotüp-grafen bazlı karbon baskılı

elektrot tasarımı ile 4,40  $\mu\text{M}$ , Erol ve ark. (2020) da XOD ile birlikte ürikaz enzimi kullandıkları polipirrol-paratoluensülfonat film bazlı elektrokimyasal biyosensör ile 5  $\mu\text{M}$ , Liao ve ark. (2020) ise polidopamin ve karbon nanoliflerle modifiye ettiği enzimatik hipoksantin biyosensörü ile 2  $\mu\text{M}$ 'lık LOD'a ulaşmıştır. Böylece, bu çalışma kapsamında geliştirilen non-enzimatik elektrospun PAN nanolif modifiyeli PGE elektrot bazlı tasarımın hem daha düşük tespit limitine sahip olduğu hem de enzim kullanımına bağlı dezavantajları (stabilite, maliyet, üretim-muhafaza güçlüğü) gideren özgün ve başarılı bir tasarım örneği teşkil ettiği anlaşılmaktadır.

Öte yandan, biyomolekül kullanılmaksızın (non-enzimatik) geliştirilen elektrokimyasal sensör örneklerine bakıldığında ise Reza ve ark. (2014)'nın geliştirdiği manganez oksit ve kitosan bazlı ksantin sensörünün LOD değeri 1,31  $\mu\text{M}$  olduğundan, bu çalışmada elde edilen 1,28  $\mu\text{M}$ 'lık Xn LOD değeri ile daha hassas bir tasarım gerçekleştirildiği anlaşılmaktadır. Hipoksantin sensörlerinden Kumar ve Swetha (2010)'nın nafyon-rutenyum dimetil sülfoksit- modifiye membran bazlı camsı karbon elektrot tasarımı ile 2,37  $\mu\text{M}$ , Kumar ve Shanmugan (2011)'in çok katmanlı karbon nanotüp bazlı camsı karbon elektrotlu tasarımı ile 2,87  $\mu\text{M}$ , Duo ve ark. (2014)'nin poliksilitol bazlı camsı karbon elektrot tasarımı ile 4,5  $\mu\text{M}$ , Juban ve Billione (2015)'in politreonin bazlı karbon pasta elektrot ile geliştirdiği sensörün 10  $\mu\text{M}$ , Vishnu ve ark. (2017)'nin 4B-kalem ucu elektrot ile geliştirdiği sensörün 1,09  $\mu\text{M}$ 'lık LOD değerlerinden, çalışmamız kapsamında geliştirilen sensörün daha düşük LOD (Hx) değerine ulaştığı (0,74  $\mu\text{M}$ ) anlaşılmaktadır. Böylece, bu çalışma kapsamında geliştirilen non-enzimatik elektrospun PAN nanolif modifiyeli PGE elektrot bazlı tasarımın ekonomik ve az malzeme gereksinimi ile üretilebilen, daha düşük tespit limitine sahip bir örnek teşkil ettiği gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasındakinden daha düşük LOD değerlerine ulaşabilen çalışmaların çoğunda ise eş zamanlı bir monitorizasyonun (ksantin, hipoksantin ve ürik asit) amaçlanmadığı dikkat çekmektedir (Dervisevic ve ark., 2017; Rahman ve ark., 2017; Şahyar ve ark., 2019; vb.). Dolayısıyla ksantin, hipoksantin ve ürik asitin eş zamanlı tayinine yönelik olarak geliştirilen ve bu çalışma ile gerçekleştirilen tasarımdan daha düşük tespit limitlerine inilen çalışmalarda ise enzim kullanımı göze çarpmaktadır (Wang ve ark., 2019; Zhu ve ark., 2021. Bu durumda, mevcut tasarımın kazanımı ise enzim kullanımının getirdiği üretim zorluğu, muhafaza ve maliyet sorunlarının elimine edilmiş olmasıdır. Pierini ve ark. (2018)'nin geliştirmiş olduğu tasarım, enzim kullanımı mevcut olmayan ve balık örnekleri için geliştirilmiş bir

sensör örneği olarak daha düşük tespit limitlerine inebilmişse de, elektrotlara uygulanan ön işlemlerin nispeten daha zor bir prosedür ile (çalışma elektrotlarının her aşamada alümina ile silinmesi, sonikasyonu, yıkama ve bekletmeden oluşan uygulama adımları) ve elektrotlara bireysel olarak uygulanması gerekliliği nedeniyle bu çalışmada tasarlanan elektrotun daha pratik bir uygulama sağladığı düşünülmektedir. Zhang ve ark. (2019)'nın Pt nanopartikül katkılı MOF yapılı elektrodu ise DOP dahil eş zamanlı bir ksantin, hipoksantin ve ürik asit monitorizasyonu gerçekleştirmekte olup serum örneklerine ksantin çözeltisi ile spike çalışması yaparak yalnızca ksantin için miktarsal tayin kapasitesini rapor etmiştir. Benzer şekilde Sudhan ve ark. (2022), bruşit ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) nanopartikül bazlı GCE elektrot tasarımı non-enzimatik sensörü ile düşük LOD'lerde eş zamanlı tayin gerçekleştirmiş fakat idrar ve kahve numuneleri üzerinde çalışmıştır. Bu çalışma da, gerek elektroğrılmış PAN nanomodifiyeli elektrot tasarımı bakımından gerekse balıktaki tazelik kriterlerinden olan hipoksantin, ksantin ve ürik asitin eş zamanlı tayinine yönelik bir model çalışma olması bakımından özgünlüğü ve taze gıda tedarik zincirindeki potansiyeliyle fark oluşturmaktadır.

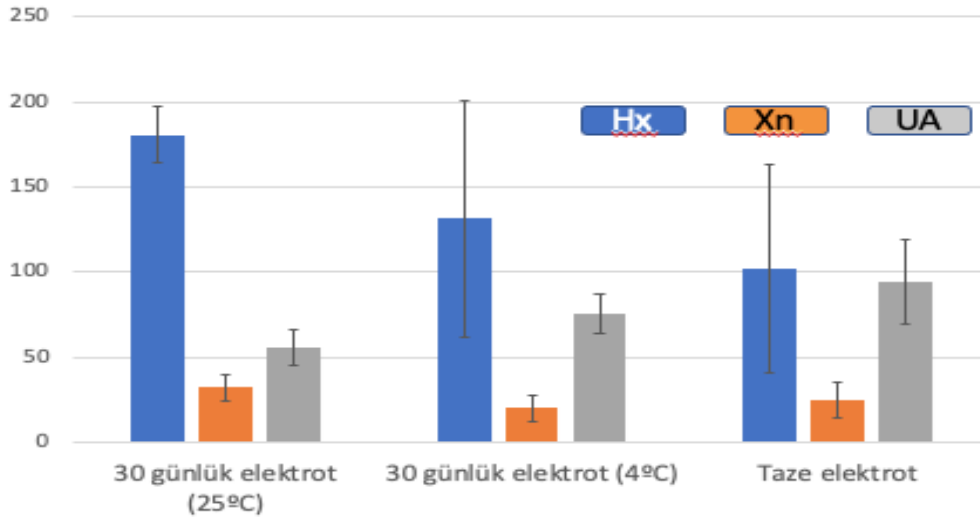
### **3.7. Elektrot Depolama ve Ölçümlerde Sapma Oranı**

4°C ve 25°C'de 30 gün süreyle muhafaza edilmiş olan elektrotların ölçüm performansı ile taze elektrotların (üretimi takip eden ilk 24 saat içerisindeki elektrotlar) kullanımıyla elde edilen DPV ölçüm sonuçları Tablo 16'da verilmiştir. DPV sonuçlarının ksantin, hipoksantin ve ürik asit için grafiksel gösterimi ise Şekil 26'da yer almaktadır.

Tablo 16. Farklı koşullarda saklanan 30 günlük elektrotlar ile taze elektrotların hipoksantin, ksantin ve ürik asit (10 µM) ölçüm performansları (nano amper: nA)

Elektrot	Hx (nA)	Xn (nA)	UA (nA)
30 günlük elektrot (25°C)	180,5 ± 16,46	32,65± 7,78	55,89± 10,48
30 günlük elektrot (4°C)	131,42± 68,93	20,52± 7,80	75,48± 11,45
Taze elektrot	101,95± 61,07	25,16± 10,87	94,70± 24,68

Sonuçlar, ortalama± standart sapma olarak verilmiştir (Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit)



Şekil 26. Farklı koşullarda muhafaza edilen elektrotların 10 µM'lık analit ölçüm performansı

Tablo 16'dan elde edilen veriler ve bu veriler ile oluşturulmuş olan Şekil 26'daki grafikte görüldüğü gibi elektrotların oda sıcaklığına maruz kaldığı zaman içerisinde, taze elektrotlar ile alınan ölçüm sonuçlarının referans alındığı değerlerden

giderek uzaklaştığı görülmektedir. Hipoksantin ve ksantin sinyalleri zamanla yükselmekte iken ürik asit sinyalleri referans değere göre giderek azalmak suretiyle sapmaktadır. Taze elektrotların performansına oranlanan DPV ölçüm sonuçları ile elde edilen sapma oranları (%), Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. 30 günlük depolama boyunca 4°C’de ve 25°C’de muhafaza edilen nanomodifiye elektrotlar ile alınan DPV ölçümlerinde % sapma oranı

% Sapma oranı	Hx	Xn	UA
4°C’de saklanmış 30 günlük elektrot	%128,90	%81,56	%79,70
25°C’de saklanmış 30 günlük elektrot	%177	%129,77	%59,02

Tablo 17’deki sonuçlar incelendiğinde, elektrotların oda sıcaklığında bekletilmesinin ölçümlerdeki sapma oranını yükselttiği görülmektedir. Bir başka deyişle, taze elektrot temini sağlanamadığı takdirde buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiş elektrotlar ile ölçüm alınmasının daha uygun olacağı gözlenmiştir. Literatürdeki sensör stabiliteleri incelendiğinde Wang ve ark. (2019)’ın 20 gün boyunca 4°C’de tampon çözelti içerisinde depoladığı Cu-MOF bazlı enzimatik (XOD) biyosensör elektrotlarında % 80; Dervisevic ve ark. (2017)’nin 4°C’de tampon çözelti içerisinde depoladığı kitosan-PPy-Au Np bazlı nanokompozit yapılı sensör elektrotlarında 18. günün sonunda % 85 oranında stabilite sağlandığı görülmektedir. Burada dikkat çeken, biyoajan kullanımına bağlı olarak elektrot muhafazasının tampon çözelti içerisinde ve soğuk koşullarda tutulma zorunluluğu olduğudur. Enzimatik olmayan sensör elektrotları incelendiğinde ise Zhu ve ark. (2019) tarafından tek aşamalı elektrodepozisyon işlemi ile üretilen heteropoliasit katkılı demir ve RGO bazlı elektrotların oda sıcaklığında 42 günlük depolama sonunda % 87,8; Tang ve ark. (2011)’in 1 hafta süreyle depoladığı elektroğrılmış PAN nanomodifiyeli CPE elektrotlarında % 85,5 oranında stabilite sağladığı görülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında üretilen elektroğrılmış PAN nanomodifiyeli PGE elektrotlarda ise oda sıcaklığında depolamanın, taze elektrotlar ile gerçekleştirilen ölçümler ile elde edilen sonuçlara kıyasla sapma oranını artırdığı ve bu nedenle 4°C’de muhafaza edilmesinin daha uygun olduğu sonucuna varılmaktadır.

### 3.8. Gerçek Örnekte (Balık) Nanobiyosensörün Uygulanması

Taze balıkların laboratuvarında aseptik şartlarda temizlenip örneklenmesiyle bozulmayı hızlandıracak bulaşmalar önlenmiş ve bozulmanın doğal sürecinde ilerlemesi sağlanmış olarak gerçekleştirilen analizlerin sonuçları Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. Gerçek örnekte elektrokimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları ve standart sapmaları

<b>Analiz Günleri/ Analizler</b>	<b>Hx (nA)</b>	<b>Xn (nA)</b>	<b>UA (nA)</b>	<b>pH</b>	<b>TMAB</b>	<b>TOPLAM KOLİFORM BAKTERİ</b>
<b>0.GÜN</b>	103,10 ± 43,45	41,98 ±9,94	19,23 ±4,97	6,15	<30x10 <sup>1</sup> kob/ g	4,30 adet /g
<b>1.GÜN</b>	26,97 ± 21,21	25,19 ±3,23	19,65 ±12,48	5,98	5x10 <sup>2</sup> kob/ g	15 adet /g
<b>3.GÜN</b>	32,38 ± 8,97	27,99 ± 7,79	21,19 ± 5,42	5,84	7,6x10 <sup>3</sup> kob/ g	15 adet/g
<b>5.GÜN</b>	39,49 ± 11,08	65,81 ± 25,06	26,36 ±6,30	6,35	2,87x10 <sup>6</sup> kob/ g	210 adet/g

DPV ölçüm sonuçları, ortalama± standart sapma olarak verilmiştir

(Hx: Hipoksantin; Xn: Ksantin ve UA: Ürik asit; TMAB: Toplam mezofilik aerobik bakteri)

Taze su ürünleri için kabul edilebilir toplam koliform limit değeri 160- 210 EMS/g (2,20- 2,32 log EMS/g) olduğundan, Tablo 18’deki toplam koliform bakteri (EMS) sonuçlarına göre balığın depolamanın 5.günü itibariyle kabul edilemez duruma ulaştığı, bu sonuçların TMAB sayısı ile desteklendiği görülmektedir. Nitekim TMAB sayısının 6 log kob/g düzeyini aşması da ürünün tüketilemez durumda olduğunu ifade etmektedir (Anon, 1991). Bu nedenle tabloda 5 günlük depolama sürecine ait analiz verileri yer almaktadır.

pH sonuçlarına bakıldığında, pH’daki düşüş eğiliminin de 5.gün itibariyle değiştiği dikkati çekmektedir. Balığın çok taze olduğu yani ölümünü izleyen ilk 3 günde kaslardaki oksijensiz solunum dolayısıyla laktik asit birikimine bağlı bir düşüş

gözlenmiş fakat 5. güne gelindiğinde bozulmaya paralel olarak uçucu aminler gibi azotlu bileşiklerin açığa çıkmasıyla pH yükselmeye başlamıştır. 3. günde 5,84'e kadar düşmüş olan pH, 5. günde 6,35'e kadar çıkmıştır. Taze balık etinin pH değer aralığı genellikle 6.0-6.5 olarak kabul edilmekte ve tüketilebilirlik sınır değeri 6,8-7,0 olarak ifade edilmektedir. Ne var ki, pH'nın kesin bir kriter konumunda olmadığı ve diğer analizlerle desteklenmesi gerektiği de belirtilmektedir (Yıldırım, 2004).

5.gün itibariyle bozulmuş olduğu görülen örneğin elektrokimyasal ölçüm sonuçlarına bakıldığında, balığın temin edildiği gün (0. gün) itibariyle hipoksantin düzeyinin daha yüksek seyrettiği, ilerleyen günlerde ise düşmeye başladığı dikkat çekmektedir. Ksantin düzeyinde dalgalı bir seyir söz konusu iken ürik asitin beklenen artışı göstermediği dikkati çekmektedir. Bu durum, Radi ve ark. (1992) tarafından ifade edilen, ürik asitin ksantin oksidaz enzimi üzerindeki yarışmasız (inkompetitif) inhibisyon özelliğine bağlanabilir. Bir başka deyişle ürik asit, ksantin oksidaz enzimine aktif bölge dışındaki bir lokasyondan bağlanarak enzimi inhibe eden bir metabolit olduğu için mevcut konsantrasyonu yansıtan sinyaller alınamamakta ve hesaplanan miktar gerçek konsantrasyonun altında kalabilmektedir.

Mevcut durumda, temin edilen balığın bozulmuş olduğu 5. gündeki ksantin, hipoksantin ve ürik asit konsantrasyonlarının hesaplanması için Şekil-a'teki doğru denklemlerinde "y" yerine 5. günde kaydedilen ort. DPV ölçüm değerleri (nano amper) yerleştirilip bu denklemlerin çözümü ile bulunan "x" değerleri, o günkü (5. gün) ksantin, hipoksantin ve ürik asit konsantrasyonlarına karşılık gelmektedir. Buna göre;

- Hx için  $y = 19,394x + 9,8766$  denkleminde  
 $39,49 = 19,394x + 9,8766$ ; Hx konsantrasyonu  $1,53 \mu\text{M}$
- Xn için  $y = 6,0118x + 9,2463$  denkleminde  
 $65,81 = 6,0118x + 9,2463$ ; Xn konsantrasyonu  $9,41 \mu\text{M}$  ve
- UA için  $y = 12,506x + 8,7465$  denkleminde  
 $26,36 = 12,506x + 8,7465$ ; UA konsantrasyonu  $1,41 \mu\text{M}$  olarak bulunur.

Sonuç olarak İzmir çiftlik çipurasının tazeliği ile ilgili olarak yapılan eş zamanlı hipoksantin, ksantin ve ürik asit monitorizasyonu sonucu ilgili değerlerin sırasıyla  $< 1,53 \mu\text{M}$  Hx;  $< 9,41 \mu\text{M}$  Xn ve  $< 1,41 \mu\text{M}$  UA olması gerektiği anlaşılmaktadır.

## **DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**

### **SONUÇ VE ÖNERİLER**

Bu tez çalışmasında, balığın tazelik kriterlerinden olan hipoksantin, ksantin ve ürik asitin eş zamanlı tayinini gerçekleştirebilmek amacıyla elektroğirilmiş PAN nanolifler ile PGE elektrotların modifikasyonuna dayanan ekonomik, pratik ve seçici sensör yüzeylerinin elde edildiği özgün bir tasarım yapılmıştır.

Bu doğrultuda öncelikli olarak kaplanmamış (yalın) PGE elektrotlar ile analitlerin ve analitlerle girişim yapma potansiyeli olan DOP ve L-ASP'in elektrokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiş, hipoksantin, ksantin ve ürik asit için sırasıyla 0,9 V; 0,6 V ve 0,2 V'luk pik potansiyellerine karşılık DOP ve L-ASP'in 0,1 V ve 0,8 V'da pikler vererek analitler ile herhangi bir çakışma olmadığı tespit edilmiştir.

Diğer yandan, nanomodifiye yüzeylerin elde edilmesine yönelik deneme üretimleri gerçekleştirilmiş ve düzenli yapıda, damlacık/boncuklanma kusuru olmayan, kusursuz morfolojiye sahip nanolifler elde edilmiştir. Elektroğirme çözelti içeriğinin de dahil olduğu elektroğirme parametreleri ise deneme üretimleriyle deneysel olarak belirlenmiştir. Buna göre %0,8 PPy içeriğinde hazırlanan PAN çözeltisi ile üretilen nanolifler ortalama 122,34 nm çapında; %0,4 PPy içeren PAN çözeltisi ile üretilen nanolifler ortalama 112,83 nm çapında ve sadece PAN çözeltisi ile (PPy=0) üretilen nanolifler ise ortalama 137,52 nm çapında olmuştur. Bu sonuçlar, PPy varlığının nanolif çaplarında büyük bir değişim yaratmadığını göstermektedir. Böylelikle bu çalışma, hipoksantin, ksantin ve ürik asitin eş zamanlı tayini kapsamında PGE nanomodifikasyonuna yönelik elektroğirilmiş PAN nanolif üretiminde prekürsör çözelti etkinliğinin de araştırılması bakımından literatürdeki ilk çalışmadır. Bu arada maddelerin elektrokimyasal karakterizasyonu, yalın PGE için tespit edilen pik potansiyellerine benzerlik göstererek Hx, Xn ve UA için sırasıyla ortalama 1,0 V; 0,7 V ve 0,3 V olarak belirlenmiştir. Bunu takiben nanomodifiye yüzeylerin seçiciliği, DOP ve L-ASP için pik potansiyellerinin 0,1 V ve 0,8 V olarak belirlenmesi ve farklı konsantrasyonlardaki karışım çözeltilerinde de her bir maddenin ayrı ayrı monitorize edilebildiğinin ortaya konmasıyla sonuçlanmıştır.

Elektroğirilmiş PAN nanolifler ile modifiye edilen PGE elektrotlarda seçiciliğin yanı sıra pratik bir analiz süreci sağlanması da tasarımın özgün değerleri

arasındadır. DPV ölçümleri öncesinde yalın PGE yüzeylerin aktivasyonu için üçlü elektrot sisteminde her bir elektroda tek tek uygulanması gereken ve elektrot başına yaklaşık 2 dakika süren elektrokimyasal ön işlem esnasında harcanan süre ve iş gücü gereksinimi giderilmiş olup nanomodifiye elektrotların 2 M NaOH çözeltisinde 1 saat/40°C bekletilmesinden ibaret olan kimyasal aktivasyon işlemiyle toplu olarak (tek seferde) analize hazır edilmesi, son kullanıcı bakımından tasarımın sağladığı kolaylığı açıkça ortaya koymaktadır.

Elektroğirilmiş PAN nanolifler ile modifiye edilen PGE elektrot yüzeylerinin gerçek balık dokularında meydana gelen bozulma reaksiyonlarındaki hipoksantin ksantine, ksantinin ürik aside dönüşümü ise ksantin oksidaz enzimi kullanılarak yapılan kontrollü bozunma çalışmasıyla incelenmiştir. Farklı konsantrasyon ve farklı sürelerde enzim (ksantin oksidaz) uygulamalarını içeren çalışmalarda, balığın dokularındaki ksantin oksidaz enzimi ile oksidasyonu katalizlenen analitlerin eş zamanlı monitorize edilebildiği ve enzimin etkisiyle hipoksantin konsantrasyonu azalırken ksantin ve ürik asitin açığa çıktığı görülmüştür. Tasarlanan sensör yüzeylerinin algılama gücü ise hipoksantin, ksantin ve ürik asit için sırasıyla 0,74 µM; 1,28 µM ve 1,32 µM olarak hesaplanan LOD değerleri ile belirlenmiş ve literatürdeki birçok çalışmaya kıyasla başarıya ulaştığı görülmüştür. LOQ değerleri ise hipoksantin, ksantin ve ürik asit için sırasıyla 2,49 µM; 4,28 µM ve 4,42 µM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca nanomodifiye sensör elektrotlarının 4°C ve 25 °C'de 30 günlük muhafazası sonrasındaki ölçüm performansı da değerlendirilmiş ve 4°C'de depolanan elektrotlar ile alınan ölçümlerde sapma oranı daha düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak bu tasarım, endüstriyel uygulamalara adapte edilebilecek ekonomik, pratik ve seçici bir tazelik sensörü elde edilmesine yönelik özgün bir ön çalışma/prototip olarak başarıya ulaşmıştır. Ayrıca, mevcut tasarıma taşınabilirlik özeliğinin kazandırılması ve sektörde örnek başı analiz (point of care, POC) gerçekleştirilebilmesini sağlayacak ileri hedeflere yönelim söz konusu olabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Aghaei E, Ghorani B, Emadzadeh B, Kadkhodae R, Tucker N., 2020. Protein-based halochromic electrospun nanosensor for monitoring trout fish freshness, *Food Control* 111: 107065.
2. Agui L., Manso J., Yanez-Sedeno P., Pingarron JM., 2006. Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold-carbon paste electrodes, *Sensors and Actuators B: Chemical* 113 (1): 272-280
3. Ahmad MW, Dey B, Sarkhel G, Yang D, Choudhury A, 2022. Sea-urchin-like cobalt-MOF on electrospun carbon nanofiber mat as a self-supporting electrode for sensing of xanthine and uric acid, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 920, 116646
4. Alafeef M., Dighe K., Moitra P., & Pan D., 2020. Rapid, ultrasensitive, and quantitative detection of sars-cov-2 using antisense oligonucleotides directed electrochemical biosensor chip, *ACS Nano* 14 (12): 17028-17045. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c06392>
5. Albeda JAV., Uzunoğlu A., Santos GNC., Stanciu LA., 2017. Graphene-titanium dioxide nanocomposite based hypoxanthine sensor for assessment of meat freshness, *Biosensors and Bioelectronics* 89, 518–524.
6. Aliheidari N., Aliahmad N., Agarwal M., & Dalir H., 2019. Electrospun nanofibers for label-free sensor applications, *Sensors* 19 (16): 3587. <https://doi.org/10.3390/s19163587>.
7. Albelda JAV., Uzunoglu A., Santos GNC., & Stanciu LA., 2016. Graphene-titanium dioxide nanocomposite based hypoxanthine sensor for assessment of meat freshness. *Biosensors and Bioelectronic*, 89(1) 518–524. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.041>
8. Anon, 1991. Resmi Gazete. 28 Mayıs 1992-sayı:20884, s:5.
9. Arduini F., Cinti S., Scognamiglio V., & Moscone D., 2020. Nanomaterial-based sensors, *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*. Copyright © 2020 Elsevier Inc. Editor(s): Chaudhery Mustansar Hussain, Pages 329-359, ISBN 9780128166994 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816699-4.00013-X>
10. Asal M., Özen Ö., Şahinler M., Baysal HT., Polatoğlu İ., 2018. An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors, *Sensor Review* 39 (3): 377-386. <https://doi.org/10.1108/SR-04-2018-0084>.
11. Avan AN., Karakaş Ö., Demirci-Çekiç S., & Apak R., 2023. Enzymatic determination of hypoxanthine in fish samples as a freshness indicator using the CUPRAC colorimetric sensor, *Enzyme and Microbial Technology* 162, 110137.

12. Aykut U., Temiz H., 2006. Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi 3, 51-59.
13. Ayrancı R., 2013. Organik- inorganik hibrit iletken polimerlerin sentezi, elektrokromik ve biyosensör uygulamaları, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Fizikokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi.
14. Bahadır E., & Sezgintürk M., 2015. Electrochemical biosensors for hormone analyses, *Biosensors and Bioelectronics* 68, 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.054>.
15. Baumgart J., 1986. *Microbiologische Untersuchung von Lebensmittel*. Behr's Verlag.B. GmbH&Co., Averhoffstrasse, 10, 2000, Hamburg 76.
16. Bhalla N., Jolly P., Formisano N., Estrela P., 2016. Introduction to biosensors, *Essays Biochemistry* 60 (1): 1-8. doi: 10.1042/EBC20150001. PMID: 27365030; PMCID: PMC4986445.
17. Borisova B., Sanchez A., Jimenez FS., Martín M., Salazar P., Parrado C., Pingarron JM., & Villalonga R., 2016. Reduced graphene oxide-carboxymethylcellulose layered with platinum nanoparticles/PAMAM dendrimer/ magnetic nanoparticles hybrids. Application to the preparation of enzyme electrochemical biosensors, *Sensors and Actuators B: Chemical* 232, 84–90.
18. Bourourou M., Holzinger M., Bossard F., Hugenell F., Maaref A., & Cosnier S., 2015. Chemically reduced electrospun polyacrylonitrile-carbon nanotube nanofibers hydrogels as electrode material for bioelectrochemical applications, *Carbon* 87(C), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.026>
19. Bulut Y., 2011. Biyosensörlerin tanımı ve biyosensörlere genel bakış. 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), 16-18 May 2011, Elazığ, Türkiye.
20. Campàs M., Garibo D., & Prieto-Simón B., 2012. Novel nanobiotechnological concepts in electrochemical biosensors for the analysis of toxins, *The Analyst* 137 (5): 1055. <https://doi.org/10.1039/c2an15736e>.
21. Chaithra KP., Vinod TP., Nagarajan P., 2023. Smartphone application-based colorimetric fish freshness monitoring using an indicator prepared by rub-coating of red cabbage on paper substrates, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 679: 132553.
22. Chauhan R., Singh J., Sachdev T., Basu T., Malhotra BD., 2016. Recent advances in mycotoxins detection, *Biosensors and Bioelectronics* 15 (81): 532-545. doi: 10.1016/j.bios.2016.03.004. Epub 2016 Mar 4. PMID: 27019032.

23. Chen J., Xu L., Xing R., Song J., Song,H., Liu D., Zhou J., 2012. Electrospun three-dimensional porous CuO/TiO<sub>2</sub> hierarchical nanocomposites electrode for nonenzymatic glucose biosensing, *Electrochemistry Communications* 20, 75–78.
24. Chen X., Li P., Luo C., & Huang C., 2022. A photoelectrochemical sensor combining CS– GSH– CuNCs and xanthine oxidase for the detection of xanthine, *Chem Electrochemical Journal Chemistry* 9 (10): e202200237.
25. Cherusseri J., Choudhary N., Kumar KS., Jung Y., Thomaset J., 2019. Recent trends in transition metal dichalcogenide based supercapacitor electrodes, *Nanoscale Horizons* 4, 840-858.
26. Cui J., Sun R., Zhao X., Zhao M., Zhang X., Li Y., & Ma C., 2023. A homogeneous hybridization magnetic biosensor based on electric field assistance for ultrafast nucleic acid detection, *Analytical Methods* 15 (27): 3325-3332. <https://doi.org/10.1039/d3ay00548h>
27. Curulli A., 2020. Nanomaterials in Electrochemical Sensing Area:Applications and Challenges in Food Analysis. *Molecules* (25): 5759. doi:10.3390/molecules25235759.
28. Çetintaş G., 2013. p-Aminofenol tayini için duyarlı grafen bazlı elektrokimyasal sensör, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi.
29. Çevik S. 2016. Xanthine biosensor based on XO/AuNP/PtNP/MWCNT hybrid nanocomposite modified GCPE, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 21(2): 314-320.
30. Çubukçu M., Timur S., Anık Ü., 2007. Examination of performance of glassy carbon paste electrode modified with gold nanoparticle and xanthine oxidase for xanthine and hypoxanthine detection, *Talanta* (74) 3: 434-439.
31. Dalkıran B., Kaçar C., Erden PE., Kılıç E., 2014. Amperometric xanthine biosensors based on chitosan-Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical* 100, 83-91.
32. Dalkıran B., Erden PE., Kılıç E. 2016. Electrochemical biosensing of galactose based on carbon materials: graphene versus multi- walled carbon nanotubes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408,(16): 4329-4339.
33. Dalkıran B., Erden PE., Kılıç E., 2017. Amperometric biosensors based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes-metal oxide nanoparticles-7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane composite for the determination of xanthine, *Talanta* 167, 286-295.
34. Dalkıran B., Kaçar C., P.E. Erden, E. Kılıç, 2018. Electrochemical xanthine biosensor based on zinc oxide nanoparticles–multiwalled carbon nanotubes–

- 1,4-benzoquinone composite, *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry* 5 (1): 317-332.
35. Deligöz E., Bilge N., 2017. Sütle gelen tehdit: Aflatoksin M1, *Turjaf* 5 (8): 846-857.
36. Dervisevic M., Custiuc E., Çevik E., Şenel M., 2015. Construction of novel xanthine biosensor by using polymeric mediator/MWCNT nanocomposite layer for fish freshness detection, *Food Chemistry* 181, 277–283.
37. Dervisevic M., Dervisevic E., Çevik E., & Şenel M., 2017a. Novel electrochemical xanthine biosensor based on chitosan–polypyrrole–gold nanoparticles hybrid bio- nanocomposite platform, *Journal of Food and Drug Analysis* 25 (3): 510–519.
38. Dervisevic M., Dervisevic E., Senel M., Cevik E., & Abasiyanik FM., 2017b. Novel amperometric xanthine biosensors based on REGO-NP (Pt, Pd, and Au) bionanocomposite film. *Food Analytical Methods*, 10, 1252-1263.
39. Dervisevic M., Dervisevic E., Şenel M., 2019. Recent progress in nanomaterial-based electrochemical and optical sensors for hypoxanthine and xanthine. A review, *Mikrochimica Acta* 186 (12): 749.
40. Devi R., Yadav S., Pundir CS., 2011a. Electrochemical detection of xanthine in fish meat by xanthine oxidase immobilized on carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film, *Biochemical Engineering Journal* 58 (1): 148-153.
41. Devi R., Thakur M., Pundir CS., 2011b. Construction and application of an amperometric xanthine biosensor based on zinc oxide nanoparticles–polypyrrole composite film, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (8): 3420-3426.
42. Devi R., Yadav S., Pundir CS., 2012a. Amperometric determination of xanthine in fish meat by zinc oxide nanoparticle/chitosan/multiwalled carbon nanotube/polyaniline composite film bound xanthine oxidase, *Analyst* 137 (3): 754-759.
43. Devi R., Yadav S., & Pundir CS., 2012b. Au-colloids–polypyrrole nanocomposite film based xanthine biosensor, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 394, 38-45.
44. Devi R., Yadav S., Nehra R., Yadav S., & Pundir CS., 2013a. Electrochemical biosensor based on gold coated iron nanoparticles/chitosan composite bound xanthine oxidase for detection of xanthine in fish meat, *Journal of Food Engineering* 115 (2): 207-214.
45. Devi R., Batra B., Suman L., Yadav S., 2013b. A method for determination of xanthine in meat by amperometric biosensor based on silver

- nanoparticles/cysteine modified Au electrode, *Process Biochemistry* 48(2): 242-249.
46. Dong S., Yan J., Zhou S., & Zhou Q., 2021. Mycotoxins detection based on electrochemical approaches, *Electroanalysis* 34 (2): 132-147. <https://doi.org/10.1002/elan.202100349>.
  47. Duo Z., Cui L., & He X., 2014. Electrochemical determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine by poly(xylitol) modified glassy carbon electrode, *Journal of Central South University* 21, 870–876. <https://doi.org/10.1007/s11771-014-2012-6>.
  48. Ebadi SV., Fakhrali A., Gharehaghaji AA., Mazinani S., Ranaei-Siadat SO., 2016. The effect of MWNTs concentration and nanofiber orientation on mechanical properties of paa nanocomposite nanofibrous web, *Wiley Online Library, Polymer Composites*, 37(11): 3149-3159.
  49. El Harrad L., Amine A., 2016. Amperometric biosensor based on prussian blue and nafion modified screen-printed electrode for screening of potential xanthine oxidase inhibitors from medicinal plants, *Enzyme and Microbial Technology* 85, 57-63.
  50. El-Samak AA., Ponnamma D., Hassan MK., Adham S., Karim A., Ammar A., Alser M., Shurbaji S., Eltai NO. & Al-Maadeed MAA., 2021. Multifunctional oil absorption with macroporous polystyrene fibers incorporating silver-doped ZnO, *ACS Omega* 6 (12): 8081-8093.
  51. Echeverri D., & Orozco J., 2022. Glycan-based electrochemical biosensors: promising tools for the detection of infectious diseases and cancer biomarkers, *Molecules* 27 (23): 8533. <https://doi.org/10.3390/molecules27238533>.
  52. Erol E., Yildirim E., & Cete S., 2020. Construction of biosensor for hypoxanthine determination by immobilization of xanthine oxidase and uricase in polypyrrole- paratoluenesulfonate film. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 24, 1695–1707. <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04715-x>
  53. Ezati P., Rhim J-W., 2020. pH-responsive pectin-based multifunctional films incorporated with curcumin and sulfur nanoparticles, *Carbohydrate Polymers* 230, 115638.
  54. Ezati P., Rhim J-W., Moradi M., Tajik H., Molaei R., 2020. CMC and CNF-based alizarin incorporated reversible pH-responsive color T indicator films. *Carbohydr Polym* (246): 116614.
  55. Fu L., Wang A., Zhang H., Zhou Q., Chen F., Su W., Yu A., Ji Z., Liu Q., 2019. Analysis of chicken breast meat freshness with an electrochemical approach, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 855, 113622.

56. Garg D., Singh M., Verma N., Monika, 2022. Review on recent advances in fabrication of enzymatic and chemical sensors for hypoxanthine, *Food Chemistry* 375: 131839.
57. Ghanbari K., Nejabati F., 2019. Construction of novel nonenzymatic Xanthine biosensor based on reduced graphene oxide/polypyrrole/CdO nanocomposite for fish meat freshness detection, *Journal of Food Measurement and Characterization* 13, 1411–1422
58. Gong W., Dou ZY., Cui LL., Liu DJ., He XQ., 2012. Electrocatalytic oxidation and simultaneous determination of uric acid, xanthine, hypoxanthine and dopamine based on B-cyclodextrin modified glassy carbon electrode, *Chemical Research in Chinese Universities* 28, 1047-1053.
59. Gorgulu, M., Çete, S., Arslan, H., & Yaşar, A., 2013. Preparing a new biosensor for hypoxanthine determination by immobilization of xanthine oxidase and uricase in polypyrrole-polyvinyl sulphonate film, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 41, 327–331. <https://doi.org/10.3109/21691401.2012.744993>.
60. Gulaboski R., 2021. Nanomaterials in voltammetric biosensors-recent achievements, *Одделение за природно-математички и биотехнички науки, МАНУ, том 42, бр. 1-2, стр. xx-xx (2021) Contributions, Section of Natural. Mathematical and Biotechnical Sciences, MASA 41(1-2): xx–xx.*
61. Gu SY, Ren J, Wu QL, 2005. Preparation and structures of electrospun PAN nanofibers as a precursor of carbon nanofibers, *Synthetic Metals* 155 (1): 157-161.
62. Guo C., You S., Li C., Chen T., & Wang X., 2021. One-step and colorimetric detection of fish freshness indicator hypoxanthine based on the peroxidase activity of xanthine oxidase grade I ammonium sulphate suspension, *Frontiers in Microbiology* 12, 791227.
63. He JH., Wan YQ., & Yu JY., 2008. Effect of concentration on electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofibers, *Fibers and Polymers* 9, 140-142.
64. Hernández-Cázares AS., Aristoy MC., Toldra F., 2010. Hypoxanthine-based enzymatic sensor for determination of pork meat freshness, *Food Chemistry* 123, 949–954.
65. Homaeigohar S., Tsai TY., Zarie ES., Elbahri M., Young TH., & Boccaccini AR., 2020. bovine serum albumin (BSA)/polyacrylonitrile (PAN) biohybrid nanofibers coated with a biomaterialized calcium deficient hydroxyapatite (HA) shell for wound dressing, *Materials Science and Engineering: C* 116, 111248.
66. Hu S., Xu C., Luo Jiahui., Luo Jun, 2000. Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified

- carbon paste electrode, *Analytica Chimica Acta* 412 (1-2): 55-61. DOI:10.1016/S0003-2670(00)00748-0.
67. Huang XW., Zou XB., Shi JY., 2014. Determination of pork spoilage by colorimetric gas sensor array based on natural pigments, *Food Chemistry* 145, 549-554.
  68. Huang CL., Wei TH., Peng SY., & Lee KM., 2019. Study of electrospun polyacrylonitrile fibers with porous and ultrafine nanofibril structures: Effect of stabilization treatment on the resulting carbonized structure, *Journal of Applied Polymer Science* 136 (46): 48218.
  69. Huang C., Xu X., Fu J., Yu D-G., Liu Y., 2022. Recent Progress in Electrospun Polyacrylonitrile Nanofiber-Based Wound Dressing, *Polymers* 14 (16): 3266. <https://doi.org/10.3390/polym14163266>
  70. Isaac B., Taylor RM., Reifsnider K., 2020. Anisotropic characterizations of electrospun PAN nanofiber mats using design of experiments, *Nanomaterials* 10, 2273.
  71. İbrahim H., Temerk Y., 2016. A novel electrochemical sensor based on B doped CeO<sub>2</sub> nanocubes modified glassy carbon microspheres paste electrode for individual and simultaneous determination of xanthine and hypoxanthine, *Sensors and Actuators B* 232, 125–137.
  72. İnce-Yardımcı A., 2022. Comparative study of the structural, mechanical and electrochemical properties of polyacrylonitrile (PAN)-based polypyrrole (PPy) and polyvinylidene fluoride (PVDF) electrospun nanofibers. *Journal of Macromolecular Science, Part B* 2022, Vol. 61, No. 9, 1103–1115.
  73. Jacobs CB., Peairs MJ., & Venton BJ., 2010. Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules, *Analytica Chimica Acta* 662 (2): 105-127.
  74. Jain U., Narang J., Chauhan N., 2015. Enhanced electrochemical performance of xanthine biosensor by core - shell magnetic nanoparticles and carbon nanotube interface, *Advanced Material Letters* 7(6): 472-479.
  75. Jairath G., Singh PK., Dabur RS., Rani M., & Chaudhari M., 2015. Biogenic amines in meat and meat products and its public health significance: a review, *Journal of Food Science and Technology* 52, 6835-6846.
  76. Joon A., Ahlawat J., Aggarwal V., Jaiwal R., Pundir CS., 2021. An improved amperometric determination of xanthine with xanthine oxidase nanoparticles for testing of fish meat freshness, *Sensing and Bio-Sensing Research* 33, 100437
  77. Juban KBB., & Billones JB., 2015. Simultaneous electrochemical determination of hypoxanthine and xanthine by poly(Threonine) film-modified electrode, *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry* 7(2): 149–160.

78. Kant R., Tabassum R., Gupta BD., 2018. Xanthine oxidase functionalized Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nanostructures as a novel scaffold for highly sensitive SPR based optical xanthine sensor, *Biosensors and Bioelectronics* 99, 637–645.
79. Kara P., Meric B., Zeytinoglu A., & Özsoz M., 2004. Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples, *Analytica Chimica Acta*, 518 (1-2): 69-76.
80. Kara P., de la Escosura-Muñiz A., Maltez-da Costa M., Guix M., Ozsoz M., & Merkoçi A., 2010. Aptamers based electrochemical biosensor for protein detection using carbon nanotubes platforms, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (4): 1715-1718.
81. Khan Z, Kafiah F, Shafi HZ, Nufaiei F, Furquan SA, Matin A, 2015. Morphology, mechanical properties and surface characteristics of electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofiber mats, *International Journal of Advanced Engineering and Nano Technology* 2, 15-22.
82. Khan MZH., Ahommed, MS., & Daizy M., 2020. Detection of xanthine in food samples with an electrochemical biosensor based on PEDOT:PSS and functionalized gold nanoparticles, *RSC Advances* 10 (59): 36147–36154.
83. Özer İ., Tezel H., Sanajou S., Yirün A., Baydar T., & Erkekoğlu P., 2022. Biosensors and their areas of application: Traditional review, *Journal of Literature Pharmacy Sciences* 11 (1): 35–48. <https://doi.org/10.5336/pharmsci.2021-86646>.
84. Keskin M., & Arslan F., 2020. Biyosensörler, *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1 (1-2): 51-60. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4317958>.
85. Khan MZH., Ahommed MS., Daizy M., 2020. Detection of xanthine in food samples with an electrochemical biosensor based on PEDOT: PSS and functionalized gold nanoparticles, *RSC Adv.* 10: 36147–36154. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/ra/d0ra06806c>.
86. Kıvrak E., 2019. Klinik analizlere yönelik aptamer tabanlı elektrokimyasal biyosensör tasarımı, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*.
87. Kıvrak E., İnce-Yardımcı A., İlhan R., Kırmızıbayrak P.B., Yılmaz S., Kara P., 2020. Aptamer-based electrochemical biosensing strategy toward human non-small cell lung cancer using polyacrylonitrile/polypyrrole nanofibers, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412, 7851–7860 <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02916-x>.
88. Kumar AS., & Shanmugam R., 2011. Simple method for simultaneous detection of uric acid, xanthine and hypoxanthine in fish samples using a glassy

- carbon electrode modified with as commercially received multiwalled carbon nanotubes, *Analytical Methods* 3, 2088–2094. <https://doi.org/10.1039/c1ay05065f>
89. Kumar AS., & Swetha P., 2010. Ru(DMSO)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> nano-aggregated nafion membrane modified electrode for simultaneous electrochemical detection of hypoxanthine, xanthine and uric acid, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 642 (2): 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.02.031>
90. Kumudavally KV., Shobha A., Vasundhara TS., Radhakrishna K., 2001. Chromatographic analysis of cadaverine to detect incipient spoilage in mutton, *Meat Science* 59 (4): 411-415.
91. Kuswandi B., Nurfawaidi A., 2017. On-package dual sensors label based on pH indicators for real- time monitoring of beef freshness, *Food Control* 82, 91-100.
92. Lan D., Zhang L., 2015. Electrochemical synthesis of a novel purine-based polymer and its use for the simultaneous determination of dopamine, uric acid, xanthine and hypo- xanthine, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 757, 107–115.
93. Lavanya N., Sekar C., Murugan R. and Ravi G., 2016. An ultrasensitive electrochemical sensor for simultaneous determination of xanthine, hypoxanthine and uric acid based on Co doped CeO<sub>2</sub> nanoparticles, *Materials Science and Engineering C* 65, 278–286.
94. Lawal T., Adeloju SB., 2010. Comparison of polypyrrole-based xanthine oxidase amperometric and potentiometric biosensors for hypoxanthine, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66, 270–275, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.06.002>.
95. Lawal AT., Adeloju SB., 2012. Progress and recent advances in fabrication and utilization of hypoxanthine biosensors for meat and fish quality assessment: a review, *Talanta* 100, 217–228.
96. Li Y., Zhai X., Wang H., Liu X., Guo L., Ji X., Wang L., Qiu H., & Liu, X., 2015. Non-enzymatic sensing of uric acid using a carbon nanotube ionic-liquid paste electrode modified with poly (β-cyclodextrin), *Microchimica Acta* 182, 1877-1884.
97. Li Z., Wang L., Li Y., Feng Y., & Feng W., 2019. Carbon-based functional nanomaterials: Preparation, properties and applications, *Composites Science and Technology* 179, 10–40. <https://doi.org/10.1016/J.COMPSCITECH.2019.04.028>
98. Liao L., Xing Y., Xiong X., Gan L., Hu L., & Deng S., 2020. An electrochemical biosensor for hypoxanthine detection in vitreous humor: A potential tool for estimating the post-mortem interval in forensic cases,

99. Listrat A., Lebret B., Louveau I., Astruc T., Bonnet M., Lefaucheur L., & Bugeon J., 2016. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality, *The Scientific World Journal*, 1-14. Article ID 3182746, <https://doi.org/10.1155/2016/3182746>
100. Liu Y., Huang J., Hou H., & You T., 2008. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid with electrospun carbon nanofibers modified electrode, *Electrochemistry Communications* 10 (10): 1431-1434.
101. Liu Y., Teng H., Hou H., You T., 2009. Nonenzymatic glucose sensor based on renewable electrospun Ni nanoparticle-loaded carbon nanofiber paste electrode, *Biosensors and Bioelectronics* 24: 3329–3334.
102. Liu, Y., Hao, M., Chen, Z., Liu, L., Liu, Y., Yang, W., & Ramakrishna, S. (2020). A review on recent advances in application of electrospun nanofiber materials as biosensors, *Current Opinion in Biomedical Engineering* 13, 174-189.
103. Liu D., Cui Z., Shang M., Zhong Y., 2021. A colorimetric film based on polyvinyl alcohol/sodium carboxymethyl cellulose incorporated with red cabbage anthocyanin for monitoring pork freshness, *Food Packaging and Shelf Life* 28, 100641.
104. Liu J., Xu Y., Liu S., Yu S., Yu Z., & Low SS., 2022. Application and progress of chemometrics in voltammetric biosensing, *Biosensors* 12 (7): 494 <https://doi.org/10.3390/bios12070494>
105. Luo A., Lian Q., An Z., Li Z., Guo Y., Zhang D., Xue Z., Zhou X., Lu X., 2015. Simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on sulfonic groups functionalized nitrogen-doped graphene, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 756, 22–29.
106. Mahboob S., Al-Ghanim KA., Al-Balawi HA., Al-Misned F., & Ahmed Z., 2018. Study on assessment of proximate composition and meat quality of fresh and stored *Clarias gariepinus* and *Cyprinus carpio*, *Brazilian Journal of Biology* 79 (4): 651-658.
107. Manthey M., Karnop G., Rehbein H., 1988. Quality changes of European catfish (*Silurus glanis*) from warm-water aquaculture during storage on ice, *International Journal of Food Science & Technology* 23 (1) : 1-9.
108. Marega C., Maculan J., Rizzi GA., Saini R., Cavaliere E., Gavioli L., Cattelan M., Giallongo G., Marigo A., & Granozzi G., 2015. Polyvinyl alcohol electrospun nanofibers containing Ag nanoparticles used as sensors for the detection of biogenic amines. *Nanotechnology*, 26(7), 075501.

109. Mercante LA., Scagion VP., Migliorini FL., Mattoso LHC., Correa D.S., 2017. Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review, *Trends in Analytical Chemistry* 91, 91-103.
110. Metin S., 2002. Modifiye atmosferde paketlemenin alabalık burgerlerinin raf ömrü üzerine etkisi, *Gıda* 27 (3): 209-217.
111. Mondal K. & Sharma A., 2016. Recent advances in electrospun metal-oxide nanofiber based interfaces for electrochemical biosensing, *RSC Advances* 6 (97): 94595-94616 <https://doi.org/10.1039/C6RA21477K>.
112. Nakatani HS., dos Santos LV., Pelegrine CP., Terezinha S., 2005. Biosensor based on xanthine oxidase for monitoring hypoxanthine in fish meat. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1 (2): 85-89 <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2005.85.89>.
113. Narang J., Malhotra N., Singhal C., Pundir CS., 2017. Evaluation of freshness of fishes using MWCNT/TiO<sub>2</sub> nanobiocomposites based biosensor, *Food Analytical Methods* 10, 522–528. DOI 10.1007/s12161-016-0594-3
114. Nasouri K, Bahrabeygi H, Rabbi A, Shoushtari AM, Kafrou A, 2012. Modeling and Optimization of Electrospun PAN Nanofiber Diameter Using Response Surface Methodology and Artificial Neural Networks, *Journal of Applied Polymer Science* 126, 127–135.
115. Noah NM., 2023. Current status and advancement of nanomaterials within polymeric membranes for water purification. *ACS Applied Nano Materials* 7, 16.
116. Oğuz E., 2018. Ürik Asit Tayinine Yönelik Yeni Bir Biyosensör Tasarımı, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi.
117. Ojani R., Alinezhad A., Abedi Z., 2013. A highly sensitive electrochemical sensor for simultaneous detection of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly(L-methionine) modified glassy carbon electrode, *Sensors and Actuators B: Chemistry* 188, 621–630.
118. Ostermann R., Cravillon J., Weidmann C., Wiebcke M., & Smarsly B. M., 2011. Metal–organic framework nanofibers via electrospinning, *Chemical Communications* 47 (1): 442-444.
119. Özokaya P., Dağbağlı S., & Kayaardı S., 2021. Detection of meat freshness: new approaches, *GIDA - Journal of Food* 46 (4): 1053-1067.
120. Özoğul F., Özoğul Y., & Kuley E., 2007. Nucleotide degradation in sardine (*Sardina pilchardus*) stored in different storage condition at 4° C, *Journal of Fisheries Sciences* 1 (1): 13-19.

121. Pierini GD., Robledo SN., Zon MA., Di Nezio MS., Granero AM., Fernandez H., 2018. Development of an electroanalytical method to control quality in fish samples based on an edge plane pyrolytic graphite electrode. Simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid. *Microchemical Journal* 138: 58–64
122. Prabhakar PK, Vatsa S, Srivastav PP, Pathak SS., 2020. A comprehensive review on freshness of fish and assessment: Analytical methods and recent innovations. *Food Research International*, Jul:133:109157. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109157.
123. Park YV., Kim SM., Lee JY., Jang W., 2015. Application of biosensors in smart packaging, *Molecular & Cellular Toxicology* 11: 277-285 doi: 10.1007/s13273- 015-0027-1
124. Pundir C., Devi R., Narang J., Singh S., Nehra J., & Chaudhry S., 2011. Fabrication of an amperometric xanthine biosensor based on polyvinylchloride membrane, *Journal of Food Biochemistry* 36 (1): 21-27. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00499.x>
125. Pundir, C.S., Devi, R., 2014. Biosensing methods for xanthine determination: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 57, 55–62.
126. Putzbach W., & Ronkainen N., 2013. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review, *Sensors* 13 (4): 4811-4840. <https://doi.org/10.3390/s130404811>
127. Qiao L., Tang X., Dong J., 2017. A feasibility quantification study of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in duck meat for freshness evaluation, *Food Chemistry* 237, 1179–1185.
128. Qiong C., Tuzhi P., & Liju Y., 1998. Silk fibroin/cellulose acetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness, *Analytica Chimica Acta* 369 (3): 245-251.
129. Radi S., Tan S., Prodanov E., Evans RA., Parks DA., 1992. Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production, *Biochimica Biophysica Acta*. Jul 31; 1122(2): 178-82. [https://doi.10.1016/10167-4838\(92\)90321-4](https://doi.10.1016/10167-4838(92)90321-4). PMID: 1322703.
130. Rahman MM. Marwani HM., Algethami FK., Asiri AM., 2017. Xanthine sensor development based on ZnO–CNT, ZnO–CB, ZnO–GO and ZnO nanoparticles: an electrochemical approach, *New Journal of Chemistry* 41, 6262-6271.
131. Raj MA., John SA., 2013. Simultaneous determination of uric acid, xanthine, hypoxanthine and caffeine in human blood serum and urine samples using electrochemically reduced graphene oxide modified electrode, *Analytical Chimica Acta* 771, 14–20.

132. Rajamäki T., Alatom H., Titvanen T., Skyttä E., Smolander M., Ahvenainen R., 2004. Application of an electronic nose for quality assessment of modified atmosphere packaged poultry meat, *Food Control* 17, 5–13.
133. Reza KK., Singh N., Yadav SK., Singh MK., Biradar AM., 2014. Pearl shaped highly sensitive Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite interface for biosensor applications, *Biosensors and Bioelectronics* 62, 47–51.
134. Ronkainen N., Halsall H., & Heineman W., 2010. Electrochemical biosensors, *Chemical Society Reviews* 39 (5): 1747. <https://doi.org/10.1039/b714449k>.
135. Saadaoui M., Sanchez A., Diez P., Raouafi N., Pingarron JM., Villalonga R. 2016. Amperometric xanthine biosensors using glassy carbon electrodes modified with electrografted porous silica nanomaterials loaded with xanthine oxidase, *Microchimica Acta* 183 (6): 2023-2030.
136. Sadeghi S., Fooladi E., Malekaneh M., 2014. A nanocomposite/crude extract enzyme- based xanthine biosensor, *Analytical Biochemistry* 464, 51-59.
137. Saeed R., Feng H., Wang X., Zhang X., Fu Z., 2022. Fish quality evaluation by sensor and machine learning: A mechanistic review, *Food Control* 137: 108902.
138. Sapountzi E., Braiek M., Chateaux J-F., Jaffrezic-Renault N., Lagarde F., & Florence L-G., 2017. Recent advances in electrospun nanofiber interfaces for biosensing devices, *Sensors* 17(8): 1887. <https://doi.org/10.3390/s17081887>
139. Saraç AR, 2011. Atatürk Baraj Gölü'nde yaşayan *Carasobarbus luteus* ve *Capoeta rutta*' da balık tazeliğinin tespiti, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
140. Sekizuka, H., 2022. Uric acid, xanthine oxidase, and vascular damage: potential of xanthine oxidoreductase inhibitors to prevent cardiovascular diseases, *Hypertension Research* 45, 772–774. <https://doi.org/10.1038/s41440-022-00891-7>
141. Sen S., Sarkar P., 2015. A novel third-generation xanthine biosensor with enzyme modified glassy carbon electrode using electrodeposited MWCNT and nanogold polymer composite film. *RSC Adv.* 5 (116): 95911–95925.
142. Sequeira-Munoz A., Ashie INA., Simpson BK., 1999. Controlling Endogenous Enzyme Activity in Seafood. In: Xiong, YL., Chi-Tang H., Shahidi F. (eds) *Quality Attributes of Muscle Foods*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4731-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4731-0_17).

143. Sharma NK., Kaushal A., Monika, Thakur S., Thakur N., Sheetal, Kumar D., Bhalla TC., 2021. Nanohybrid electrochemical enzyme sensor for xanthine determination in fish samples. *3 Biotech* 11: 212
144. Sharma NK., Thakur D., Kumar D., 2023. Novel enzymatic biosensor utilizing a MoS<sub>2</sub>/MoO<sub>3</sub> nanohybrid for the electrochemical detection of xanthine in fish meat, *ACS Omega* 8, 31962–31971.
145. Si Y., Park JW., Jung S., Hwang G-S., Goh E., & Lee HJ., 2018. Layer-by-layer electrochemical biosensors configuring xanthine oxidase and carbon nanotubes/ graphene complexes for hypoxanthine and uric acid in human serum solutions, *Biosensors and Bioelectronics* 121, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.074>.
146. Sinelli N., Limbo S., Torri L., di Egidio V., Casiraghi E., 2010. Evaluation of freshness decay of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaged at different temperatures using NIR and MIR spectroscopy, *Meat Science* 86, 748–752.
147. Silva N., Magalhães J., Freire C., & Delerue–Matos C., 2018. Electrochemical biosensors for Salmonella: state of the art and challenges in food safety assessment, *Biosensors and Bioelectronics* 99, 667-682. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.019>
148. Sudhan N., Annita S., Meenakshi S., Sekar C., 2022. Brushite nanoparticles based electrochemical sensor for detection of uric acid, xanthine, hypoxanthine and caffeine, *Analytical Biochemistry* 659, 114947.
149. Sujiwo J., Kim H-J., Song S-O., Jang A., 2019. Relationship between quality and freshness traits and torrymeter value of beef loin during cold storage, *Meat Science* 149, 120–125.
150. Supraja P., Singh V., Vanjar SRK. & Singh SG., 2020. Electrospun CNT embedded ZnO nanofiber based biosensor for electrochemical detection of Atrazine: a step closure to single molecule detection, *Microsystems & Nanoengineering* 13;6:3 doi: 10.1038/s41378-019-0115-9. PMID: 34567618; PMCID: PMC8433164
151. Şahin EM., 2017. Rosmarinik asitin NADH sensörlerinde ve alkol dehidrojenaz temelli biyosensörlerde medyatör olarak etkilerinin incelenmesi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
152. Şahyar BY., Kaplan M., Özsöz M., Çelik E., Ötleş S., 2019. Electrochemical xanthine detection by enzymatic method based on Ag doped ZnO nanoparticles by using polypyrrole, *Bioelectrochemistry* 130, 107327.

153. Şenman NH., 2007. Gökkuşığı alabalıklarında (*onchornycus mykiss*) biyojen aminlerin HPLC ile saptanması, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
154. Tang X., Liu Y., Hou H., You T., 2011. A nonenzymatic sensor for xanthine based on electrospun carbon nanofibers modified electrode, *Talanta* 83 (5): 1410-1414.
155. Thakur D., Pandey CM., Kumar D., 2022. Highly sensitive enzymatic biosensor based on polyaniline-wrapped titanium dioxide nanohybrid for fish freshness detection, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 194 (8): 3765-3778. doi: 10.1007/s12010-022-03931-7.
156. Thakur MS., & Ragavan KV., 2013. Biosensors in food processing. *Journal of food science and technology*, 50, 625-641.
157. TS EN ISO 4833-1.,2014. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique.
158. Torres AC., Ghica ME., & Brett CMA., 2013. Design of a new hypoxanthine biosensor: Xanthine oxidase modified carbon film and multi-walled carbon nanotube/carbon film electrodes, *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 405, 3813–3822. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6631-1>.
159. Tripathi A., Elias AL., Jemere AB., Harris DK., 2022. Amperometric determination of xanthine using nanostructured nio electrodes loaded with xanthine oxidase, *ACS Food Science & Technology* 2, 8.
160. Turgut B., 2023. Biyosensörler ve sağlık, *International Academic Social Resources Journal* 8 (47): 2492-2498 (e-ISSN: 2636-7637).
161. Tüylek Z., 2017. Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim, *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 6 (2): 71-80.
162. Villalonga R., Diez P., Eguilaz M., Martinez P., & Pingarron JM., 2012. Supramolecular immobilization of xanthine oxidase on electropolymerized matrix of functionalized hybrid gold nanoparticles/single-walled carbon nanotubes for the preparation of electrochemical biosensors. *ACS Applied Materials & Interfaces* 4(8): 4312-4319.
163. Villarino N., Lavilla I., Pena-Pereira F., Bendicho C., 2023. Droplet-based luminescent sensor supported onto hydrophobic cellulose substrate for assessing fish freshness following smartphone readout, *Food Chemistry* 424: 136475.
164. Vishnu N., Gandhi M., Rajagopal D., & Senthil Kumar A., 2017. Pencil graphite as an elegant electrochemical sensor for separation-free and simultaneous sensing of hypoxanthine, xanthine and uric acid in fish samples, *Analytical Methods* 9, 2265–2274. <https://doi.org/10.1039/C7AY00445A>

165. Vogiazzi V., Cruz A., Mishra S., Shanov V., Heineman W., & Dionysiou D., 2019. A comprehensive review: development of electrochemical biosensors for detection of cyanotoxins in freshwater. *ACS Sensors* 4 (5): 1151-1173. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00376>
166. Waheed Y., Yang F., Sun D., 2021. Role of asymptomatic hyperuricemia in the progression of chronic kidney disease and cardiovascular disease, *Korean Journal of Internal Medicine* 36, 1281–1293.
167. Wang Z., Dong X., Li J., 2008. An inlaying ultra-thin carbon paste electrode modified with functional single-wall carbon nanotubes for simultaneous determination of three purine derivatives, *Sensors Actuators B Chemistry* 131, 411–416.
168. Wang Y., Tong L.-l., 2010. Electrochemical sensor for simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly (bromocresol purple) modified glassy carbon electrode, *Sensors Actuators B Chemistry* 150: 43–49.
169. Wang Y., 2011. Simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine at poly(pyrocatechol violet)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 88, 614–621.
170. Wang M., Zheng Z., Liu J., & Wang C., 2017. Pt-Pd bimetallic nanoparticles decorated nanoporous graphene as a catalytic amplification platform for electrochemical detection of xanthine, *Electroanalysis* 29 (5): 1258–1266.
171. Wang, Z., Ma, B., Shen, C., Lai, O., Tan, C., Cheong, L., 2019. Electrochemical Biosensing of Chilled Seafood Freshness by Xanthine Oxidase Immobilized on Copper-Based Metal–Organic Framework Nanolif Film, *Food Analytical Methods* 12, 1715–1724.
172. Wei W., Dong S., Huang G., Xie Q., Huang T., 2018. MOF-derived Fe<sub>2</sub> O<sub>3</sub> nanoparticle embedded in porous carbon as electrode materials for two enzyme-based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chem* 260: 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.20>.
173. Wen Y., Chang J., Xu L., Liao X., Bai L., Lan Y., Li M., 2017. Simultaneous analysis of uric acid, xanthine and hypoxanthine using voltammetric sensor based on nanocomposite of palygorskite and nitrogen doped graphene, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 805, 159–170.
174. Wojnowski W., Majchrzak T., Dymerski T., Gebicki J., Namiesnik J., 2017. Electronic noses: Powerful tools in meat quality assessment, *Meat Science* 131, 119–131.
175. Wojnowski W., Namieśnik J., Płotka-Wasyłka J., 2019. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry

for in situ determination of biogenic amines in meat: Estimation of meat's freshness, *Microchemical Journal* 145, 130–138.

176. Wu L., Pu H., Sun D-W., 2019. Novel Techniques for Evaluating Freshness Quality Attributes of Fish: A Review of Recent Developments, *Trends in Food Science & Technology* 83: 259-273. ISSN 0924-2244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.002>
177. Wu J., Liu H., Chen W., Ma B., & Ju H., 2023. Nature reviews bioengineering device integration of electrochemical biosensors, *Nature Reviews Bioengineering* 1, 346–360. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00032-w>
178. X., 2019. Untitled. *Journal of Marine Science Research and Oceanography*, 2(2). <https://doi.org/10.33140/jmsro.02.02>.
179. Xia Y., Zweier JL., 1995. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart, *The Journal of Biological Chemistry* 270 (32): 18797-18803.
180. Yaman YT., 2022. Nano-elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak DNA ile doksorubisin etkileşiminin araştırılması, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 26 (2): 229–235. <https://doi.org/10.19113/sdufenbed.1038858>
181. Yang T., Huang H., Lin Q., Zhang L., & Liu J., 2016. Recent progresses in nanobiosensing for food safety analysis, *Sensors* 16 (7): 1118 <https://doi.org/10.3390/s16071118>.
182. Yazdanparast S., Benvidi A., Abbasi S., Rezaeinasab M., 2019. Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensor using poly(L-aspartic acid)/MWCNT bio- nanocomposite for xanthine detection: A meat freshness marker, *Microchemical Journal* 149, 104000.
183. Ye WW., Ding YT., Sun Y., Tian F., & Yang M., 2017. A nanoporous alumina membrane based impedance biosensor for histamine detection with magnetic nanoparticles separation and amplification, *Procedia Technology* 27, 116–117. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2017.04.051>
184. Yumnam M., Hatiboruah D., Mishra R., Sathyaseelan K., Nath P., Mishra P., 2023. A Smartphone-based optical sensor with polyaniline label for quantitative determination of freshness of freshwater fish fillets, *Sensors & Actuators: A. Physical* 361, 114557.
185. Yıldırım ŞY., 2004. İstanbul'da sabit pazar koşullarında satışa sunulan su ürünlerinin kalite düzeylerinin belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri

Enstitüsü, Su Ürünleri Fakültesi İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

186. Zen JM., Lai YY., Yang HH., Senthil Kumar A., 2022. Multianalyte sensor for the simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid based on a preanodized nontronite-coated screen-printed electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 84: 237–244.
187. Zhai X., Li Z., Shi J., Huang X., Sun Z., Zhang D., Zou X., Sun Y., Zhang J., Holmes M., Gong Y., Povey M., & Wang S., 2019. A colorimetric hydrogen sulfide sensor based on gellan gum-silver nanoparticles bionanocomposite for monitoring of meat spoilage in intelligent packaging, *Food chemistry* 290, 135-143.
188. Zhai X., Zou X., Shi J., Huang X., Sun Z., Li Z., Sun Y., Li Y., Wang X., Holmes M., Gong Y., Povey M., Xiao J., 2020a. Amine-responsive bilayer films with improved illumination stability and electrochemical writing property for visual monitoring of meat spoilage, *Sensors and Actuators B: Chemical* 302, 127130.
189. Zhang J., Lei J., Pan R., Xue Y., Ju H., 2010. Highly sensitive electrocatalytic biosensing of hypoxanthine based on functionalization of graphene sheets with water-soluble conducting graft copolymer, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2): 371-376.
190. Zhang Y., Wang Y., Jia J., Wang J., 2012a. Nonenzymatic glucose sensor based on graphene oxide and electrospun NiO nanofibers, *Sensors and Actuators B* 171–172: 580–587.
191. Zhang F., Wang Z., Zhang Y., Zheng Z., Wang C., Du Y., Ye W., 2012b. Simultaneous electrochemical determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly(L-arginine)/graphene composite film modified electrode, *Talanta* 93: 320–325.
192. Zhang L., Lei J., Zhang J., Ding L., 2012c. Amperometric detection of hypoxanthine and xanthine by enzymatic amplification using a gold nanoparticles-carbon nanohorn hybrid as the carrier, *The Analyst* 137 (13): 3126-31.
193. Zhang X., Dong J., Qian X., Zhao C., 2015. One-pot synthesis of an RGO/ZnO nanocomposite on zinc foil and its excellent performance for the nonenzymatic sensing of xanthine, *Sensors and Actuators B: Chemical* 221, 528-536. ISSN 0925-4005,  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.039>
194. Zhang W., Dixon M., Saint C., Teng K., & Furumai H. 2018. Electrochemical biosensing of algal toxins in water: the current state-of-the-art. *ACS Sensors* 3 (7): 1233-1245. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00359>

195. Zhang L., Li S., Xin J., Ma H., Pang H., Tan L., Wang X., 2019. A non-enzymatic voltammetric xanthine sensor based on the use of platinum nanoparticles loaded with a metal-organic framework of type MIL-101 (Cr). Application to simultaneous detection of dopamine, uric acid, xanthine and hypoxanthine, *Microchimica Acta* 186, 1–10. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-018-3128-4>
196. Zhang Y., Luo Q., Ding K., Liu SG., & Shi X., 2021. A smartphone-integrated colorimetric sensor of total volatile basic nitrogen (TVB-N) based on Au@MnO<sub>2</sub> core-shell nanocomposites incorporated into hydrogel and its application in fish spoilage monitoring, *Sensors and Actuators B: Chemical* 335, 129708. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2021.129708>
197. Zhao Z., Lei W., Zhang X., Wang B., & Jiang H., 2010. ZnO-based amperometric enzyme biosensors, *Sensors* 10 (2): 1216-1231. <https://doi.org/10.3390/s100201216>
198. Zhou S., Li W., Liu W., & Zhai J., 2023. Removal of metal ions from cyanide gold extraction wastewater by alkaline ion-exchange fibers, *Hydrometallurgy* 215, 105992.
199. Zhu D., Guo D., Zhang L., Tan L., Pang H., Ma H., & Zhai M., 2019. Non-enzymatic xanthine sensor of heteropolyacids doped ferrocene and reduced graphene oxide via one-step electrodeposition combined with layer-by-layer self-assembly technology, *Sensors and Actuators B: Chemical* 281, 893–904.
200. Zhu M., Chu J., Xin X., Wang KP., O'Halloran H. Ma, Yang G., 2021. Hierarchical and hollow boron/nitrogen co-doped yolk-shell mesoporous carbon nanospheres attached to reduced graphene oxide with high sensing performance for the simultaneous detection of xanthine and guanosine, *Sensors and Actuators B: Chemical* 343, 130068. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130068>