

Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Biyosensörde Piruvat Tayini

İlayda Dikkulak¹, Muhammet Samet Kılıç^{2*} ve Şeyda Korkut Uru³

^{1,2}Biyomedikal Mühendisliği Bölümü / Mühendislik Fakültesi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Türkiye

³Çevre Mühendisliği Bölümü / Mühendislik Fakültesi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Türkiye

*(msametk@beun.edu.tr) Başlıca yazarın mail adresi

Özet – Biyolojik bir numunedeki piruvat konsantrasyonunu hızlı ve hassas bir şekilde belirleyebilmek, çeşitli uygulama alanlarında son derece önemlidir. Piruvatın tayini tıp alanında, diyabetik asidoz, alkol polinefriti, hipovitaminozu teşhis etmede yardımcı olur, ayrıca solunumun izlenmesinde de önemli bir parametredir. Gıda endüstrisinde ise, süt ürünleri gibi çeşitli ortamların bakteriyel kontaminasyonunun bir göstergesidir. Konvansiyonel ölçüm teknikleri analiz için genellikle numuneye karmaşık ön işlemler gerektirir. Bu sebeple, sürekli, hızlı, duyarlı ve numuneyi direkt analiz edebilen biyosensör sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada polikaprolakton/çok duvarlı karbon nanotüp modifiye film üzerine piruvat oksidaz enzimi immobilize edilerek bir piruvat biyosensör probu hazırlanmıştır. Hazırlanan prob ile piruvatın ölçümünü sağlamak için elektrokimyasal bir ölçüm tekniği olan diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılmıştır. Sistemde piruvat, enzimatik reaksiyon sonucu ürün olarak ortaya çıkan hidrojen peroksit üzerinden dolaylı olarak ölçülmüştür. Çalışmada biyosensör probunun 100 µM-500 µM arasında piruvat konsantrasyonunu hassas bir şekilde tespit edebildiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler – Biyosensör, Diferansiyel Puls Voltametri, Piruvat, Piruvat Oksidaz, Çok Duvarlı Karbon Nanotüp.

I. GİRİŞ

Piruvat, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması sonucu oluşan bir organik asittir. Vücuttaki hücrelerde enerji üretiminde önemli bir rol oynar ve aerobik solunumda sitrik asit döngüsünün son ürünüdür [1], [2].

Piruvat tayini özellikle biyoproses, gıda ve tıbbi analizlerde önemli bir unsurdur [3]. Oral kanser hastalığının gidişatında piruvik asit üretimi ve atılımında dengesizlik olasılığı olması, piruvat konsantrasyonunun takibinin hastalık kontrolünde önemini ortaya çıkarmaktadır. Yapılan çalışmalar sağlıklı ve oral kanser teşhisi koyulan bireyler arasında piruvik asit seviyesinde gözle görülür bir değişiklik olduğunu göstermiştir [4]. Sağlık alanında piruvatın önemi ve ölçüm yöntemi hakkında verilebilecek bir diğer örnek ise; serum örneklerinde piruvat konsantrasyonu tespiti için geliştirilmiş enzim tabanlı amperometrik bir piruvat biyosensörüdür. Çalışmada sağlıklı ve kardiyojenik streten mustarip yetişkin bireylerin serumlarındaki

piruvat seviyesi analiz edilmiştir. Bu bireylerin serumlarındaki piruvat seviyesi birbirleriyle karşılaştırılmış ve kardiyojenik streten mustarip bireylerin serumlarındaki piruvat seviyesinin önemli ölçüde yüksek çıktığı rapor edilmiştir [2]. Hayvanlar üzerinde yürütülen bir çalışmada, *Paralichthys olivaceus* cinsi bir balığın metabolik hastalıkları araştırılmıştır. Bu çalışmada biyosensörün pratik uygulanabilirliği balık serum örneklerinde incelenmiştir. Çalışma sonucunda balık örneklerinde piruvat tespiti için enzim bazlı biyosensörlerin, ideal bir aday olabilir şeklinde vurgusu rapor edilmiştir [5]. Piruvat biyosensörleri gıda güvenliği ve kalitesi alanında soğan keskinliğinin tespiti için kullanılmaktadır [6]. Biyosensörün ölçümlerinin doğruluğuna duyulan güven, özellikle düşük keskinliğe sahip soğanların popülaritesi artırmaktadır. Düşük keskinliğe sahip soğanlar halk dilinde yumuşak veya tatlı soğan olarak anılır. Yumuşatılmış soğan dokusundaki piruvat konsantrasyonu soğan üreten çoğu ülkede keskinliği kalite güvence göstergesi olarak

kullanmaktadır. Bu sebeple piruvat konsantrasyonunun biyosensörlerle hızlı ve pratik ölçümü gıda güvenliği ve kalitesi alanında dünya çapındaki önemini ortaya koymaktadır. Soğanın yanı sıra süt ürünlerinin kalitesi kapsamında da pirüvat analizi rol oynamaktadır. Pirüvatın süt ürünlerinde bakteriler tarafından tüketildiği bilinmektedir. Dolayısıyla yapılan bir çalışmada sütün bakteriyel kalitesinin göstergesi olarak pirüvat incelenmiştir [7]. Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanları ile uygun bir dönüştürücünün birleşmesiyle oluşan araçlardır. Bu cihazlar, çok çeşitli maddeleri tanıyarak analiz etme yeteneğine sahiptir. Enzim tabanlı biyosensörlerde bu tanıma işlemi enzim-substrat özgülüğünden faydalanılarak yapılmaktadır. Örneğin, kan şekeri seviyesini ölçen glukometreler dünya çapında bir ticari başarıya imza atmıştır. Biyosensörün çalışma prensibi glikoz oksidaz enzimi ile kanda bulunan glikozun enzimatik bir reaksiyona girmesi ve uygun bir dönüştürücü eleman ile konsantrasyonun tespiti üzerine kurulmuştur. Analiz edilen her parametre için henüz ticari bir biyosensör bulunmasa da bu alandaki gelişim hızlıca artış göstermektedir. Biyosensörler hızlı, pratik ve uzman gerektirmeyen bir kullanım sundukları için yaşam kalitesini arttırmaları [8].

Bu çalışmada elektrokimyasal bir ölçüm tekniği olan diferansiyel puls voltametri (DPV) ve siklik voltametri tekniği kullanılmıştır. Tasarlanan biyosensör elektrodu yüzeyinde gerçekleşen temel enzimatik reaksiyon Eşitlik 1'de sunulmuştur. Pirüvatın dolaylı olarak hidrojen peroksit üzerinden ölçümü elektrokimyasal olarak sağlanmıştır.



II. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmayı yaparken kullanılan materyalleri ve yöntemleri ayrıntılı olarak açıklayın. Farklı kaynaklardan yaptığımız alıntılar referanslarda verilmeli ve kaynak gösterilmelidir.

A. Kimyasallar

Polikaprolakton ((C₆H₁₀O₂)_n), pirüvat oksidaz (Aerococcus sp., iyofilize toz, ≥35 birim/mg protein), sodyum pirüvat (CH₃COCOONa, ≥99), magnezyum klorür heksahidrat (MgCl₂ · 6H₂O, ≥99 %), flavin adenin dinükleotit disodyum hidrat

tuzu (FAD, ≥95 %), lityum perklorat (LiClO₄, %99), hidrojen peroksit (H₂O₂, ≥%35), potasyum dihidrojen fosfat (KH₂P0₄) ve dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HP0₄), diklorometan (≥99.9 %) Sigma-Merck firmasından satın alınmıştır. Kısa çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT, %95+, OD<8 nm, 0,5-2 µm uzunluk) Nanostructured & Amorphous Materials, Inc. Şirketinden temin edilmiştir. Tiamin pirofosfat klorür (TPP, >%98) Tokyo Chemical Industry firmasından satın alınmıştır. CHI 1040B marka elektrokimyasal analizatör, 2 mm çapındaki altın (Au) elektrot, Ag/AgCl referans elektrot, karşıt elektrot (Pt çucuk), elektron temizleme kiti ve cam hücreler CH Instrument firmasından temin edilmiştir.

B. Çözeltilerin Hazırlanması

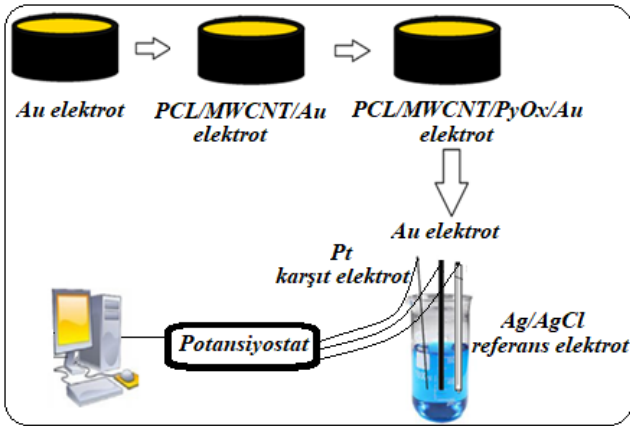
Kofaktörlü Fosfat Tampon Hazırlanması: 50mM, pH 7.0 fosfat tamponu potasyum dihidrojen fosfat (KH₂P0₄) ve dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HP0₄) kullanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözelti içerisine destek elektroliti olarak konsantrasyonu 0.7 mg/mL olacak şekilde lityum perklorat (LiClO₄) ve enzimatik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ihtiyaç duyulan 50 µM tiamin pirofosfat klorür (TPP), 5 µM flavin adenin dinükleotit (FAD) ve 1 mM magnezyum klorür (MgCl₂) kofaktörleri ilave edilmiştir.

Polikaprolakton (PCL)/ Çok Duvarlı Karbon Nano Tüp (MWCNT) Çözeltisinin Hazırlanması: 10 mg PCL ve 1mg MWCNT 10 mL diklorometan içerisine eklenmiştir. Çözelti bir ultrasonik banyoya yerleştirilmiş ve 5 dakika sonikasyona tabi tutularak MWCNT'nin disperse olması sağlanmıştır.

C. Biyosensör Elektrodunun Hazırlanması

Altın elektrot, farklı boyutlara sahip γ-alüminyum tozlarıyla (1, 0.3 ve 0.05 mikron) ile zımparalanarak temizlenmiştir. Daha sonra altın elektrodu, referans elektrot (Ag/AgCl) ve karşıt elektrot (platin çubuk) elektrokimyasal hücrenin içine yerleştirilmiş ve 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde -1 ve +1 V arasında 50 mV/s tarama hızında siklik voltametri (CV) tekniğiyle voltamogramlar alınmıştır. Bu işleme aynı voltamogram görüntülerine ulaşmaya kadar devam edilmiştir. Son olarak altın elektrot ultra saf su ile yıkanarak elektrot temizleme basamağı tamamlanmıştır. Destek materyali olarak kullanılan 10 mg/mL PCL/MWCNT modifiye

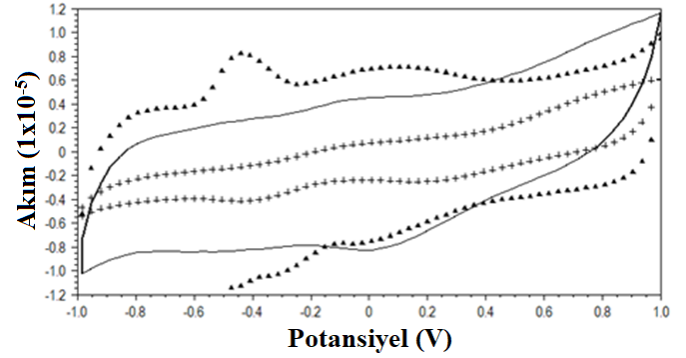
polimerinden altın elektrot yüzeyine 3 μL damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından 2 mg/mL konsantrasyona sahip piruvat oksidaz çözeltisinden 6 μL , modifiye polimerik film kaplı elektrot yüzeyine damlatılmış ve enzim immobilizasyonunun gerçekleşmesi için oda koşullarında yaklaşık 2 saat kuruması beklenmiştir. Son olarak immobilizasyonu sağlanamamış enzimi yüzeyden uzaklaştırabilmek için elektrot ultra saf su ile hafifçe yıkanmıştır. Şekil 1'de biyosensör elektrotunun hazırlanma süreci şematik bir diyagramla özetlenmiştir.



Şekil 1. Biyosensör elektrotu hazırlanma sürecinin şematik gösterimi

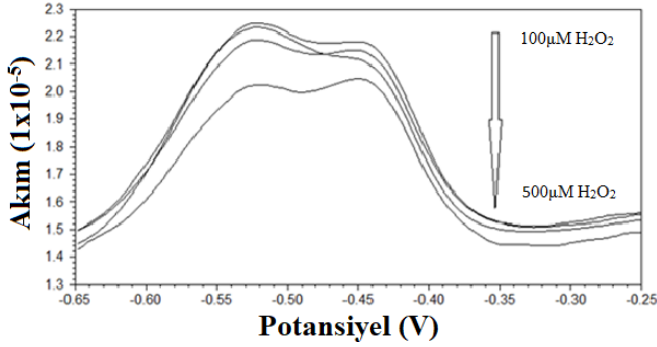
III. BULGULAR VE TARTIŞMA

Hazırlanan Au çalışma elektrotunun yüzey özelliklerindeki değişimi inceleme amacıyla temiz Au çalışma elektrotunun, sadece PCL ile kaplanan elektrodun ve PCL/MWCNT ile kaplanan elektrotun siklik voltametri (tarama hızı; 100 mV/s, potansiyel aralık; -1 V - +1 V) deneyleri 50 mM, pH 7.0 kofaktörlü fosfat tamponunda üçlü elektrot sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen voltamogramlar üst üste yerleştirilerek Şekil 2'de sunulmuştur. Temiz Au ve PCL kaplı elektrotların voltamogramları incelendiğinde, Au elektrodun yalıtkan bir polimer olan PCL ile kaplanması akım değerlerinin düşmesine ve bu durumun voltamogramın içe doğru kapanmasına yol açtığı gözlenmiştir. Bu bağlamda yüzey iletkenliğini ve alanını artırabilmek amacıyla elektrot MWCNT ile modifiye edilmiştir. Modifiye elektrotun voltamogramında akım değerlerinin artması MWCNT'nin pozitif yönde etki ettiğini açıkça göstermiştir. Sonuç olarak çalışmada MWCNT modifiye PCL, çalışma elektrodunun destek materyali olarak kullanılmıştır.



Şekil 2. Biyosensör elektrotu hazırlanma sürecinin şematik gösterimi. Temiz Au elektrot, PCL kaplı Au elektrot ve MWCNT/PCL kaplı Au elektrot siklik voltamogramları (▲: PCL/MWCNT modifiye Au elektrot, +: PCL modifiye Au elektrot, —: Au elektrot)

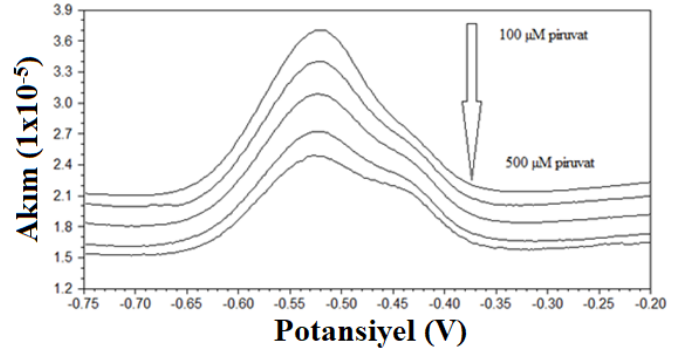
Piruvat'ın uygun voltaj altında piruvat oksidaz ile enzimatik reaksiyonu sonucu asetil fosfat, CO_2 ve H_2O_2 açığa çıkmaktadır (Eşitlik 1). Reaksiyon ürünü olarak açığa çıkan H_2O_2 üzerinden elektrokimyasal bir ölçüm gerçekleştirilmektedir. Daha sonra bu ölçüm bir dönüştürücü sayesinde elektrik sinyallerine çevrilir ve analit konsantrasyonu ile ilişkilendirilir. Bu durumda, oluşan H_2O_2 'nin yüzeyde farklı voltajlardaki elektrokimyasal aktivitesinin belirlenerek, piruvat ölçümü için voltajın doğru tespit edilmesi son derece önemlidir. Ölçüm voltajının belirlenebilmesi için piruvat oksidaz (PyOx) immobilize PCL/MWCNT modifiye Au elektrodu (PCL/MWCNT/PyOx) üçlü elektrot sisteminde farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 (100 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM ve 500 μM H_2O_2) çözeltileriyle -1 V - +1 V arasında diferansiyel puls voltametri tekniğiyle test edilmiştir. DPV voltamogramı Şekil 3'de sunulmuştur. Voltamogram incelendiğinde -0.40 V - -0.60 V civarında artan H_2O_2 konsantrasyonu ile orantılı olarak bir akım düşüşü gözlenmiştir. Enzimatik reaksiyon sonucunda üretilen H_2O_2 , kimyasal reaksiyona göre tüketilen piruvat konsantrasyonunu doğru/doğruya en yakın bulmaya olanak sağlayacaktır. Dolayısıyla -0.40 V - -0.60 V civarında gelen akım piki piruvatın konsantrasyonunun tespit edileceği voltaj aralığı olarak belirlenmiştir.



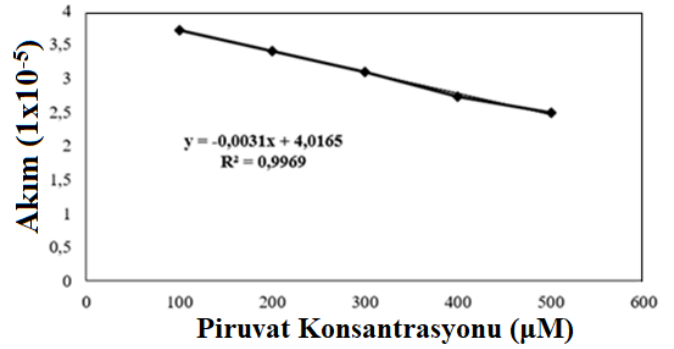
Şekil 3. Biyosensör elektrotu hazırlanma sürecinin şematik gösterimi Farklı H₂O₂ konsantrasyonlarının (100µM, 200µM, 300µM, 400 µM ve 500 µM) diferansiyel puls voltamogramları

Biyosensör elektrodu, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış pirüvat çözeltileri (100 µM - 500 µM arısında) ile DPV tekniği kullanılarak -0.8 V ile -0.2V arasında test edilmiştir. DPV voltamogramı Şekil 4'te sunulmuştur. Şekil 4'ten, artan pirüvat konsantrasyonu ile -0.5 V civarında düzenli bir akım düşüşü açıkça gözlenmektedir. Elde edilen akım sonuçlarının pirüvat konsantrasyonuna karşı grafiği çizilmiştir ve Şekil 5'te biyosensörün kalibrasyon eğrisi sunulmuştur. Tasarlanan pirüvat biyosensörünün 100 µM-500 µM pirüvat konsantrasyon aralığında lineerlik gösterdiği ve bu aralıkta pirüvatı doğru bir şekilde analiz edebileceği anlaşılmıştır. Arai ve çalışma arkadaşları, poli(merkaptop-benzokinon) polimerine pirüvat oksidaz enzimini immobilize ederek bir biyosensör probu hazırlamışlardır. Çalışmada, pirüvatın 1-2000 µM'lık konsantrasyon aralığında hassas bir şekilde tayin edilebileceği rapor edilmiştir [9]. Bir başka çalışmada glikoz ve pirüvatı aynı biyosensör probu ile tayin etmeye yönelik bir prob dizayn edilmiştir. Bu amaçla glikoz oksidaz ve pirüvat oksidaz, iletken poli(nötral red) filmi üzerine çapraz bağlama ajanı olarak kullanılan gluteraldehit yardımıyla immobilize edilmiştir. Pirüvat için elde edilen lineer aralık 0.09-0.6 µM olarak rapor edilmiştir [10]. 6-aminokaproik ve 3-merkaptopropiyonik asitlerinin ince film olarak kullanıldığı pirüvat oksidaz tabanlı bir biyosensör çalışmasında lineer aralık 2.5-50 µM olarak rapor edilmiştir [3]. Tasarlanan başka bir biyosensör probunda pirüvat oksidaz nanoparçacıklarının grafen kuantum noktaları ile çapraz bağlandığı ve daha sonrasında prusya mavisi ile modifikasyonunun sağlandığı sunulmuştur. Çalışmada, biyosensörün 10-100 µM konsantrasyon aralığında lineerlik gösterdiği ve bu aralıkta pirüvatı ölçebildiği rapor edilmiştir [5]. Çalışmalar

incelendiğinde tasarlanan biyosensörün geniş bir aralıkta pirüvat konsantrasyonunu ölçebildiği söylenebilir. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim biyosensörün hassasiyetini vermektedir. Eğim kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemden ($y = -0.0031x + 4.0165$) kolayca tespit edilmektedir. Bu doğrultuda pirüvat biyosensörünün 0.0031 µA/µM'lık bir hassasiyet değerine sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. Farklı pirüvat konsantrasyonlarının (100µM, 200µM, 300µM, 400 µM ve 500 µM) diferansiyel puls voltamogramları.



Şekil 5. Pirüvat biyosensörü kalibrasyon eğrisi

IV. SONUÇLAR

PCI/MWCNT modifiye film üzerine pirüvat oksidaz enzimi immobilize edilerek bir pirüvat biyosensör probu hazırlanmıştır. Pirüvat konsantrasyonunun net olarak analiz edilebildiği voltaj aralığı tespit edilmiş ve sonrasında diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak yapılan ölçümlerde probun 100 µM-500 µM arasında pirüvat konsantrasyonunu hassas bir şekilde tespit edebildiği ve hassasiyetinin 0.0031 µA/µM olduğu bulgusuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] S. Ada, C. Ertürk, A. Uçar, , S. Akyüz, F. Doğan, B. Yücel, “Kanser hücre metabolizması” *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*, pp. 66-75, 2021.
- [2] M. Malik, R. Chaudhary, C.S. Pundir, “An improved enzyme nanoparticles based amperometric pyruvate biosensor for detection of pyruvate in serum,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol.146, pp. 1102-1112, 2019.
- [3] E. Bayram, E. Akyılmaz,” A new pyruvate oxidase biosensor based on 3-mercaptopropionic acid/6-aminocaproic acid modified gold electrode,” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, pp. 418-422, 2014.
- [4] M. Bhat, K.V.V. Prasad, D. Trivedi, B. Rajeev, H. Battur, “Pyruvic acid levels in serum and saliva: A new course for oral cancer screening?,” *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, vol. 20, pp. 102-105, 2016.
- [5] D. Thirumalai, S. Kim, S. Kim, S.C. Chang, “Reagentless amperometric pyruvate biosensor based on a prussian blue- and enzyme nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode,” *ACS Omega*, vol.5, pp.30123-30129,2020.
- [6] R.J.B. Leote, M.E. Ghica, C.M.A. Brett, “Pyruvate oxidase biosensors based on glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and poly(neutral red) synthesized in ethaline deep eutectic solvent,” *Electroanalysis*, vol. 34, pp.724-734, 2022.
- [7] F. Shapiro, N. Silanikove, “Rapid and accurate determination of malate, citrate, pyruvate and oxaloacetate by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Application in colorful juices and fermentable food (yogurt, wine) analysis,” *Food Chemistry*, vol.129, pp. 608-613, 2019.
- [8] J. Castillo, S. Gáspár, S. Leth, M. Niculescu, A. Mortari, I. Bontidean, V. Soukharev, S.A. Dorneanu, A.D. Ryabov, E. Csöregi,” Biosensors for life quality - design, development and applications,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 102, pp. 179-194, 2004.
- [9] G. Arai, T. Noma, H. Habu, I. Yasumori, “Pyruvate sensor based on pyruvate oxidase immobilized in a poly(mercapto-p-benzoquinone) film,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 464, pp. 143-148. 1999.
- [10] M. E. Ghica, M.M.A. Brett, “Development of novel glucose and pyruvate biosensors at poly(neutral red) modified carbon film electrodes,” *Application to natural samples. Electroanalysis*, vol.18, pp. 748-756, 2006.