

Article Arrival Date

19.02.2021

Article Type

Research Article

Article Published Date

20.03.2022

Doi Number: <http://dx.doi.org/10.38063/ejons.622>**ELEKTROKİMYASAL ÇALIŞMALARDA FARKLI ASETAT TAMPON DERİŞİMLERİNİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

THE EFFECT OF DIFFERENT ACETATE BUFFER CONCENTRATIONS ON ENZYME ACTIVITY IN ELECTROCHEMICAL STUDIES

Dr. Ahmet İLHAN

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD

ORCID NO: 0000-0003-2896-6280

Dr. Öğr. Üyesi Umut KÖKBAŞ

Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD

ORCID NO: 0000-0003-4028-3458

Prof. Dr. Levent KAYRIN

Girne Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD

ORCID NO: 0000-0002-8751-3129

ÖZET

Genel olarak enzimler çözünebilir; substrat, pH, tampon derişimi ve sıcaklık gibi çeşitli etkenler tarafından inhibe edilebilirler. Optimum tampon konsantrasyonu enzim aktivitesi için önemli bir faktördür. Tampon çözeltileri, yalnızca küçük bir belirsizliğe sahip olan bir sistemin pH'ını sabit tutmak için kullanılan belirli bir tamponlama kapasitesine sahiptir. Tampon kapasitesi hem konsantrasyona hem de pH'ya bağlıdır.

Elektrokimyasal çalışmalarda tampon derişimi önemli bir etken iken, çoğu çalışmada bu etken göz ardı edilmektedir. Bu çalışmada tampon derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için, çapraz bağlı hidrojen peroksidaz enzimi kullanılarak, enzim aktivitesinin farklı tampon derişimindeki iyonik kuvvet etkisinden yararlandı. Altın elektrot üzerine HRP enzimi, BSA, jelatin ve glutaraldehit'in UV ışık yardımıyla immobilize edilmesi ile hazırlandı. Aynı koşullarda hazırlanan elektrotlar ile 25, 50, 100 ve 200 mM asetik asit tamponunda ölçümler gerçekleştirildi.

Bu çalışmada sadece doğru pH değerinde çalışmanın yeterli olmadığı aynı zamanda doğru derişimde çalışmanın önemi vurgulanmak istenmiştir. Kullanılacak tamponun derişiminin, enzim performansında önemli olduğunu destekleyen daha farklı çalışmalarla da ortaya koyulması gerektiğini söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Asetat tamponu, Hidrojen peroksidaz, Elektrokimya**ABSTRACT**

In general, enzymes are soluble; They can be inhibited by various factors such as substrate, pH, buffer concentration and temperature. Optimum buffer concentration is an important factor for enzyme activity. Buffer solutions have a certain buffering capacity that is used to keep the pH

of a system constant, which has only a small uncertainty. Buffer capacity is dependent on both concentration and pH.

While buffer concentration is an important factor in electrochemical studies, this factor can be ignored in most studies. In this study, to determine the effect of buffer concentration on enzyme activity, the ionic strength effect of enzyme activity at different buffer concentrations was utilized by using cross-linked hydrogen peroxidase enzyme. It was prepared by immobilizing HRP enzyme, BSA, gelatin and glutaraldehyde on the gold electrode with the help of UV light. Measurements were made in 25, 50, 100 and 200 mM acetic acid buffer with electrodes prepared under the same conditions.

In this study, it was aimed to emphasize that working at the right pH value is not sufficient, but also the importance of working at the right concentration. We can say that the concentration of the buffer to be used should be revealed by different studies that support the importance of enzyme performance.

Keywords: Acetate buffer, Hydrogen peroxidase, Electrochemistry

1. GİRİŞ

Enzimler, tamponlardaki pH değişikliklerinden etkilenir. Farklı pH değerinde enzimler farklı katalitik aktivite gösterirler. Optimum pH, enzimlerin en yüksek katalitik aktivite gösterdiği pH değeridir. Farklı enzimlerin farklı optimum pH değerleri olmakla birlikte, enzimlerin katalitik aktivitesini etkileyen çeşitli faktörlerden biridir.¹

Tamponlar ortamın pH değerini koruyan çözeltilerdir. Enzimlerde meydana gelen tam aktivite kaybı, kullanılan tamponun yüksek veya düşük pH değerlerinde ortaya çıkar. Tampon çözeltilerinde moleküller arası bağların kırılması pH'daki değişikliklere neden olabilir, böylece meydana gelen iyonik değişim enzimin yapısında ve katalitik aktivitesinde değişikliklere yol açar.

Elektrokimyada tampon çözeltilerin farklı konsantrasyonları, enzim aktivitesinde farklılıklara neden olabilir. Kullanılan tamponun hidrojen içeriği, enzimlere hidrojen iyonlarının bağlanmasına ve çıkarılmasına neden olarak enzimlerin katalitik aktivitesini etkiler. Bu durum enzimler üzerindeki negatif yüke, pozitif yüklü hidrojen iyonlarının bağlanması ile ortaya çıkar.²

Asetat tamponu elektrokimyasal analizlerde pH ortamını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Asetat tamponu içerisindeki iyonlar azda olsa hidrojen peroksidin ayrışmasını neden olur. Böylece asetat iyonları kısmen hidrojen peroksidin ayrışmasını kataliz ederek, yaban turpu peroksidazına (HRP) benzer bir yeteneğe sahiptir.³

Analizler HRP enziminin katalitik aktivitesinden yararlanılarak, hidrojen peroksit varlığında ve asetat tamponu (pH 6.0) içinde gerçekleştirilmiştir. Horseradish peroksidaz (HRP), geniş bir ticari ürün yelpazesi ile yoğun olarak çalışılan bir enzimdir.⁴ Bu çalışmada enzim tampon uyumundan en iyi şekilde yararlanmak için HRP enzimi ve asetat tamponu tercih edilmiştir.

Elektrokimya çalışmalarında, glukoz oksidaz enzimi ile beraber HRP enzimi en sık kullanılan enzimdir.⁵ Elektrokimya testleri yapılırken birçok faktör dikkate alınmalıdır. Tampon seçimi ve bileşimi, enzim tipi ve derişimi ile substrat tipi ve derişimi bu faktörlerden bazılarıdır.⁶

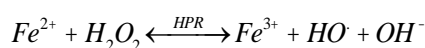
Asidik koşullar altında Fe^{+2} rolündeki organik maddenin H_2O_2 tarafından oksidatif bozunması ilk olarak 1894 yılında HJ Fenton tarafından keşfedilmiştir.⁷ Yakın geçmişte Fenton reaksiyonu birçok tehlikeli organik maddenin uzaklaştırılması için atık suların arıtılması işlemlerinde verimli bir şekilde kullanılmıştır.⁸⁻⁹ 1964 yılında Kanadalı araştırmacı H.R. Eisenhaner bunu organik maddelerin bozunması için uygulamıştır.¹⁰⁻¹¹⁻¹² Çalışmamızın yöntemi HRP enziminin, substrat olarak H_2O_2 'i kullanmasına dayanmaktadır.¹³

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Altın elektrot yüzeyindeki kirliliği temizlemek için, üzerine gama alümina solüsyonu damlatılmış kadife yüzeyden yararlanıldı. Daha sonra altın elektrot, sonikatör ve %96'lık etanolde 5-10 dakika bekletildikten sonra distile su içerisinde bir süre durulandı.

Biyoaktif tabaka, Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot üzerine HRP enzimi, BSA, jelatin ve glutaraldehit'in UV ışık yardımıyla immobilize edilmesi ile hazırlandı. Altın elektrot yüzeyi üzerine immobilize edilecek tabakayı hazırlamak için; 15 mg BSA ve 67,5 mg jelatin, pH'sı 6,0 ve derişimi 100 mM olan 300 μ L asetat tamponu içerisinde çözülüp 35 °C'de 20 dakika bekletildi. Bu karışımın 10 μ L'si, 10 μ L daha önce hazırlanan 1 mg/mL derişimdeki enzim çözeltisi ile karıştırılarak elde edilen toplam hacim 20 μ L olarak altın çalışma elektrodu üzerine yayıldı. Daha sonra üzerine 5 μ L %3'lük glutaraldehit eklendi ve 1 saat UV ışık altında bekletildi.

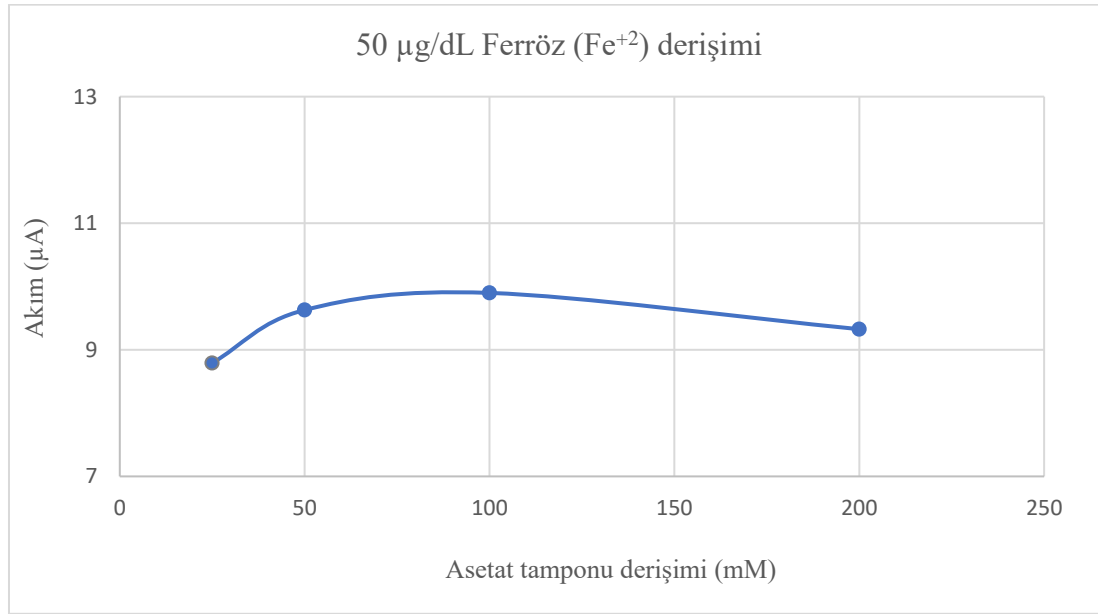
Hazırlanan elektrot, pH'sı 6,0 ve derişimleri 25, 50, 100 ve 200 mM olan 5 mL asetat tamponunun bulunduğu tepkime hücrelerine sırasıyla alındı. Bütün optimizasyon deneyleri aynı koşullarda hazırlanan Au ($Au \rightleftharpoons Au^+ + e^-$) elektrot kullanılarak yapıldı.



İndirgenmenin meydana geleceği bir potansiyelde çalışıldığında, devreden geçen anodik akım arta kalan H₂O₂ derişimi ile doğru, Fe⁺² derişimi ile ters orantılıdır. Farklı asetat tamponlarının enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için fenton reaksiyonundan yararlanılmış, yapılan ölçümlerde tepkime sonunda arta kalan H₂O₂ derişimi ölçülerek analizler gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

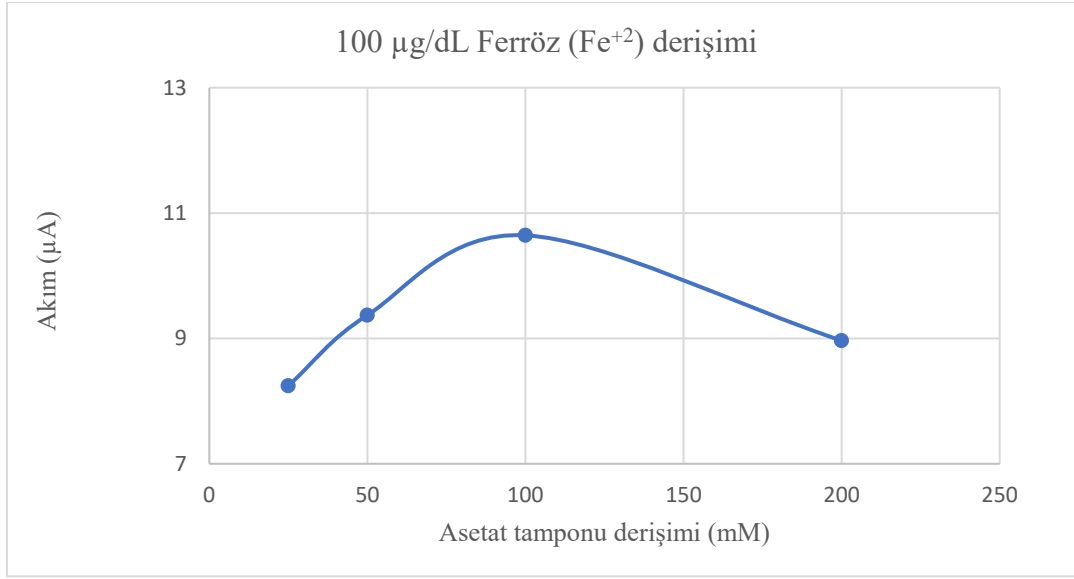
Hazırladığımız altın elektrodumuz ile sırasıyla 25, 50, 100 ve 200 mM derişimlerinde asetat tamponu ilave edilen ölçüm hücresine her bir konsantrasyon için 50 µg/dL ferröz demir (Fe⁺²) ve 10 g/dL H₂O₂ ilave edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu ölçülerden elde edilen değerler şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 50 µg/dL ferröz demir (Fe⁺²) derişiminde elde edilen enzim aktivite değerleri.

Şekil 3.1’deki grafik incelendiğinde 50 µg/dL ferröz demir (Fe⁺²) ve 10 g/dL H₂O₂ varlığında yapılan ölçümlerde en yüksek HRP enzim aktivitesi 100 mM asetat tamponunda test edilmiştir.

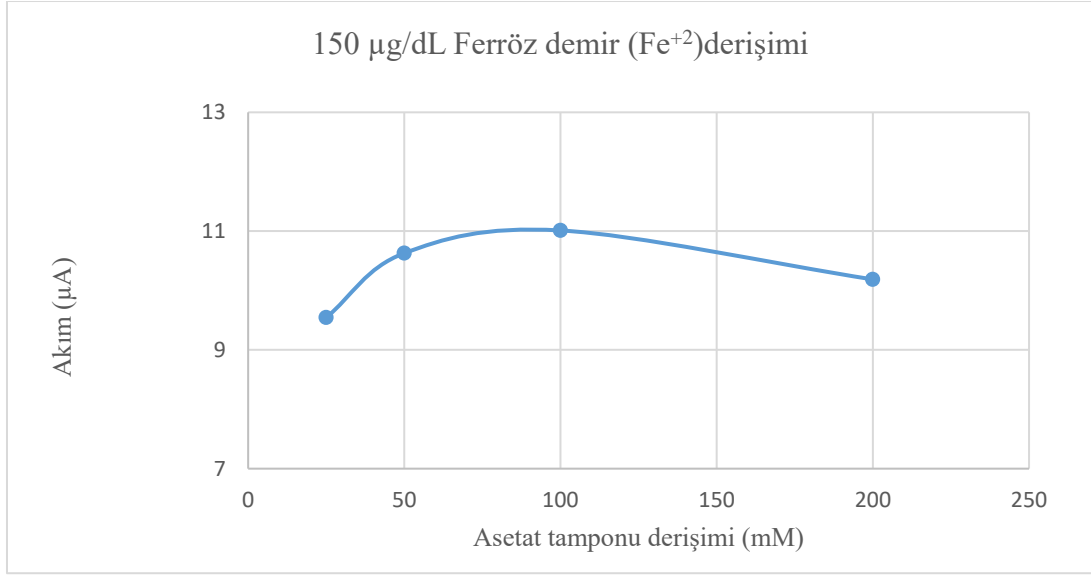
Hazırladığımız altın elektrodumuz ile sırasıyla 25, 50, 100 ve 200 mM derişimlerinde asetat tamponu ilave edilen ölçüm hücresine her bir asetat tamponu konsantrasyon için 100 µg/dL ferröz demir (Fe⁺²) ve 10 g/dL H₂O₂ ilave edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu ölçülerden elde edilen değerler şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. 100 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) derişiminde elde edilen enzim aktivite değerleri.

Şekil 3.2'deki grafik incelendiğinde 100 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) ve 10 g/dL H₂O₂ varlığında yapılan ölçümlerde en yüksek HRP enzim aktivesi 100 mM asetat tamponunda test edilmiştir.

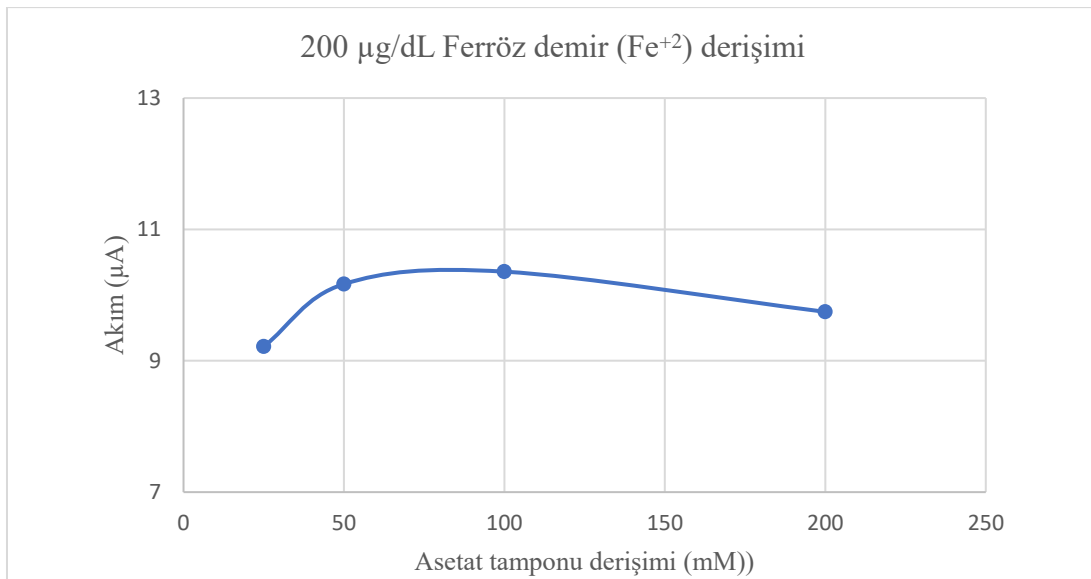
Hazırladığımız altın elektrodumuz ile sırasıyla 25, 50, 100 ve 200 mM derişimlerinde asetat tamponu ilave edilen ölçüm hücresine her bir asetat tamponu konsantrasyon için 150 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) ve 10 g/dL H₂O₂ ilave edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu ölçülerden elde edilen değerler şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. 150 µg/dL ferröz demir (Fe⁺²) derişiminde elde edilen enzim aktivite değerleri.

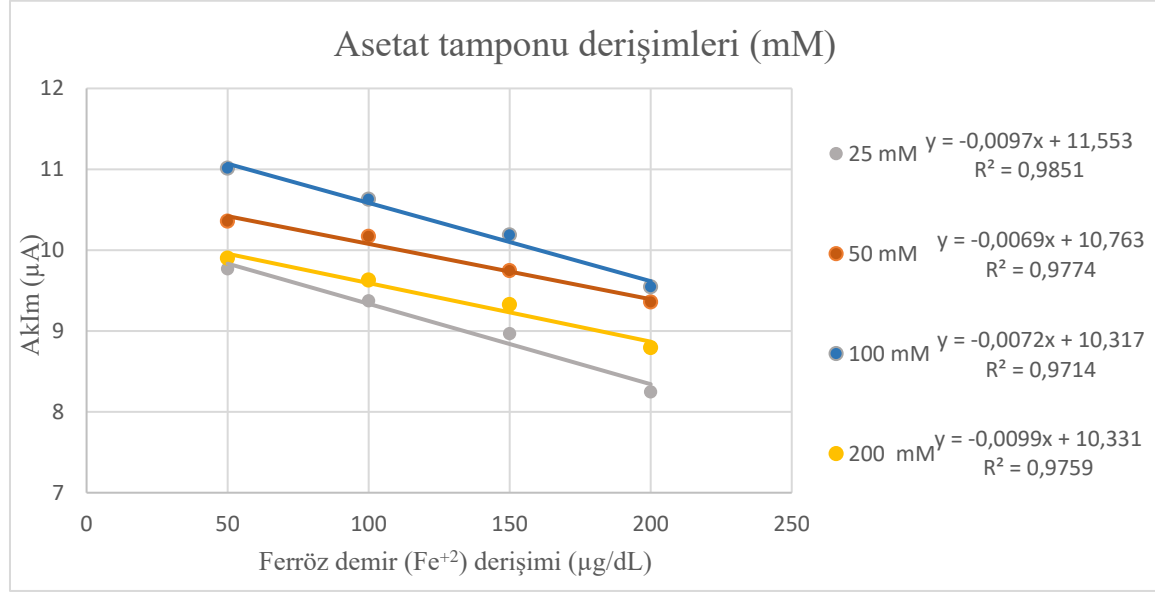
Şekil 3.3'deki grafik incelendiğinde 150 µg/dL ferröz demir (Fe⁺²) ve 10 g/dL H₂O₂ varlığında yapılan ölçümlerde en yüksek HRP enzim aktivesi 100 mM asetat tamponunda test edilmiştir.

Hazırladığımız altın elektrodumuz ile sırasıyla 25, 50, 100 ve 200 mM derişimlerinde asetat tamponu ilave edilen ölçüm hücresine her bir asetat tamponu konsantrasyon için 200 µg/dL ferröz demir (Fe⁺²) ve 10 g/dL H₂O₂ ilave edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu ölçülerden elde edilen değerler şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. 200 µg/dL ferröz demir (Fe^{+2}) derişiminde elde edilen enzim aktivite değerleri.

Şekil 3.4'deki grafik incelendiğinde 200 µg/dL ferröz demir (Fe^{+2}) ve 10 g/dL H_2O_2 varlığında yapılan ölçümlerde en yüksek HRP enzim aktivesi 100 mM asetat tamponunda test edilmiştir.



Şekil 3.5. Farklı asetat tampon derişimlerine bağlı olarak geręekleşen enzim aktivite değerleri.

25, 50, 100 ve 200 mM derişimlerinde asetat tamponu derişimlerinde, 50, 100, 150 ve 200 µg/dL ferröz demir (Fe^{+2}) kullanılarak HPOD enzimi için elde edilen katalitik aktivite değerleri Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, 50, 100, 150 ve 200 µg/dL ferröz demir (Fe^{+2}) kullanılarak yapılan ölçümlerin tamamında optimum enzim aktivitesi 100 mM asetat tamponu derişiminde elde edilmiştir. 50 ve 200 mM asetat tamponu derişimlerinde HPOD enzim aktivitesinin kısmen azaldığı, 25 mM asetat tamponu derişiminde HPOD enzimi katalitik aktivitesinde daha fazla bir düşüşün olduğu gözlenmiştir. 100 mM asetat tamponu derişiminden daha az veya daha yüksek derişimlerde HPOD enzim aktivitesinin azaldığı görülmektedir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elektrokimyasal çalışmalarda farklı tampon derişimlerinin enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için 25, 50, 100 ve 200 mM derişimlerdeki asetik asit tamponları hazırlanmış ve 5'er

mL ölçüm hücresine koyularak her derişim için ayrı ölçme işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı astat tamponu derişimlerinde HRP enzimi farklı katalitik aktivite göstermiştir. Optimum enzim aktivitesinin, derişimi 100 mM olan asetik asit tamponunda gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuçlar elektrokimyasal çalışmalarda tamponun pH değerinin yanı sıra, tamon derişiminin de enzim aktivitesi üzerinde önemli ölçüde etkili olduğunu göstermektedir.

100 mM üzerindeki derişimlerde iyonik kuvvetin artması ile HPOD enzimi katalitik aktivitesinde azalmayı tetiklediği düşünülebilir. Aynı zamanda 100 mM altındaki derişimlerde enzimin aktivitesindeki düşüşe iyonik kuvvetin azalmasının neden olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar doğrultusunda enzimlerin optimum katalitik aktivite gösterdiği kendilerine özgü tampon derişimlerinin olduğunu söyleyebiliriz. Elektrokimya çalışmalarda enzimlerle yapılan testlerde tamponun türü ve pH'sının yanı sıra, tampon derişiminde dikkat edilmesi gerektiğini önerebiliriz.

KAYNAKLAR

1. <https://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm>. Erişim tarihi: 07.12.2021
2. Beynon, R.J.& Easterby, J.S. (1997). Buffer solutions & Oxford: IRL Press, 244-245.
3. Luo, Y.; Shen, R.; Li, T.; Xiong, C.; Li, G.; & Ling, L. (2019). The peroxidase-mimicking function of acetate and its application in single-enzyme-based glucose test paper. *Talanta*. 196(1):493-497.
4. Humer, D. & Spadiut O. (2019). Improving the Performance of Horseradish Peroxidase by Site-Directed & *International Journal of Molecular Sciences*. 20(4):916.
5. Frazer, D.M. & Anderson, G.J. (2005) Iron imports. I. Intestinal iron absorbtion and its regulation & *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289(4): G631-G635.
6. Onyeogaziri, F.C. & Papanephytous C.A. (2019). General Guide for the Optimization of Enzyme Assay Using the Design of Experiments Approach & *SLAS Discov*. 24(5):587-596.
7. Fenton, H.J. (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans*, 65: 899–910.
8. Barbusinski, K. (2009). Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and*

Engineering, 16(3):347-358.

9. Neyens, E. & Baeyens, J.A. (2009). Review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation
J technique. Hazard. Mater, 98:33–50.
10. Bautista, P.; Mohedano, A.F.; Casas, J.A.; Zazo, J.A. & Rodriguez, J.J. (2008). An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. J. Chem. Technol. Biotechnol, 88: 1323–1338.
11. Huang, C.P.; Dong, C.; & Tang, Z. (1993). Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment. Waste Management, 13(5-7): 361-377.
12. Gulkaya, İ.; Surucu, G.A. & Dilek, F.B. (1993) Importance of H_2O_2/Fe^{2+} ratio in Fenton's treatment of
a carpet dyeing wastewater. Journal of Hazardous Materials, 136(3): 763-769.
13. Lyublinskaya, O. & Antunes, F. (1993). Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H_2O_2 biosensor. HyPer. Redox Biol, 24