



Araştırma Makalesi/Research Article

Tampon Derişiminin Biyosensör Cevabına Etkisi
[Effect Of Buffer Concentration On Biosensor Response]

Ahmet İlhan^{1a}, Umut Kökbaş², Levent Kayrın²

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD Adana

²Girne Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD KKTC

Özet

Amaç: Bütün enzimlerin kendine spesifik bir optimum pH değeri bulunmaktadır. Enzim çalışmalarında optimum pH değerinde bulunmak için tampon çözeltiler kullanılmaktadır. Enzimatik sistemlerde tampon derişimleri anahtar rol oynamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Enzim temelli biyosensörlerde kullanılan çalışma hücresi tamponunun derişiminin biyosensör cevabı üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla ferrik demir tayini yapan biyosensör sisteminde farklı derişimlerde tamponlar kullanılarak sistemin aynı standart çözeltiliye verdiği cevaptaki derişimler incelenmiştir.

Bulgular: Elektrokimyasal çalışmalarda tampon derişiminin değışmesinin elde edilecek sonuçları ciddi miktarda değıştirebileceği gözlemlenmiştir.

Sonuç: Elektrokimyasal çalışmalarda optimum tampon derişimi sağlıklı sonuçlar elde etmek için elzemdir.

Anahtar Kelimeler: Tampon derişimi, Biyosensör, Demir

Abstract

Objectives: All enzymes have a specific optimum pH value. Buffer solutions are used for optimal pH value in enzyme studies. Buffer concentrations play a key role in enzymatic systems.

Material and Methods: In order to examine the effects of working cell buffer concentration used in enzyme-based biosensors on biosensor response, changes in the system's response to the same standard solution were studied using buffers in different concentrations in the biosensor system that determined ferric iron.

Results: In electrochemical studies, it has been observed that changing the buffer concentration can change the results of other applications.

Conclusions: In electrochemical studies, optimum buffer concentration is essential to obtain healthy results.

Keywords: Buffer concentration, Biosensor, Iron

İletişim adresi / Address for Correspondence:

Ahmet İlhan  <https://orcid.org/0000-0001-7353-4853>

Umut Kökbaş  <https://orcid.org/0000-0003-4028-3458>

Levent Kayrın  <https://orcid.org/0000-0002-8751-3129>

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD, Adana

E-mail: umutkokbas@gmail.com

Geliş Tarihi/Received: 15 Şubat 2019, Kabul Tarihi/Accepted: 28 Nisan 2019, Çevrimiçi Yayın/Published Online: 30 Aralık 2019

GİRİŞ

Genel olarak enzimler çözüdür; substrat, pH, tampon derişimi ve sıcaklık gibi çeşitli etkenler tarafından inhibe edilebilirler. Enzimlerin stabilite, endüstride kullanımları için işleme koşulu altında yetersizdir. Bu nedenle, enzimin immobilizasyonu, serbest enzim problemlerini çözmek için en basit yöntemdir. Enzimin performansı, stabilitesi, aktivitesi ve seçiciliği immobilizasyon araçlarıyla geliştirilebilir. Hareketsizleştirme, reaksiyonun kontrolünü iyileştirir ve enzim tarafından ürün kontaminasyonunu önler^{1, 2}.

Tampon çözeltileri, yalnızca küçük bir belirsizliğe sahip olan bir sistemin pH'ını sabit tutmak için kullanılan belirli bir tamponlama kapasitesine sahiptir.

Tampon kapasitesi, sistemin yoğun bir özelliği olarak 1 L solüsyonda bir birim pH değişikliğine neden olan kuvvetli asit veya kuvvetli baz (tampon solüsyondaki) miktarı olarak tanımlanmıştır. Tampon kapasitesi hem konsantrasyona hem de pH'a bağlıdır^{3, 4}.

Optimum tampon konsantrasyonu enzim aktivitesi için önemli bir faktördür. Optimum enzim aktivitesi için tampon konsantrasyonu enzimden enzime farklılık gösterebilir^{5, 6}.

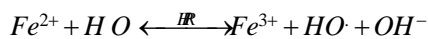
Bu çalışmada tampon derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek için; çapraz bağlı hidrojen peroksidaz enzimi kullanılmış, enzim aktivitesinin farklı tampon derişimindeki iyonik kuvvet etkisinden yararlanılmıştır⁷.

GEREÇ ve YÖNTEM

Biyosensörün biyoaktif tabakasını oluşturmak için: 1,15 mg BSA ve 67,5 mg jelatin, pH'sı 6,0 ve derişimi 100 mM olan 300 µL asetat tamponu içerisinde çözüp 35 °C'de 20 dakika bekletildi.

2. Karışımın 10 µL'si, 10 µL daha önce hazırlanan 1 mg/ml derişimdeki enzim çözeltilisi ile karıştırılarak elde edilen toplam hacim 20 µL olarak altın çalışma elektrodu üzerine yayıldı. Daha sonra üzerine 5 µL %3'lik glutaraldehit eklendi ve 1 saat UV ışık altında bekletildi.

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



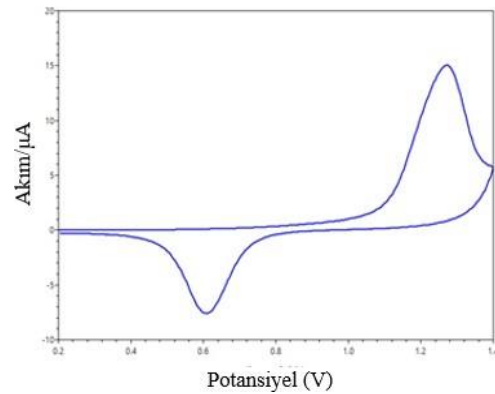
2 2

İndirgenmenin meydana geleceği bir potansiyelde çalışıldığında, devreden geçen anodik akım arta kalan H₂O₂ derişimi ile doğru, Fe²⁺ derişimi ile ters orantılıdır. Geliştirdiğimiz kan serum demiri biyosensörü tepkime sonunda arta kalan H₂O₂ derişimini ölçerek analiz etmektedir.

Çalışmamızın yöntemi HRP enziminin, substrat olarak H₂O₂'i kullanmasına dayanmaktadır⁷. Çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla daha önceden yapılmış olan çalışmalar göz önüne alınmıştır. Biyoaktif tabaka, Au ($Au \rightarrow Au^+ + e^-$) elektrot üzerine HRP enzimi, BSA, jelatin ve glutaraldehit'in UV ışık yardımıyla immobilize edilmesi ile hazırlandı.

BULGULAR

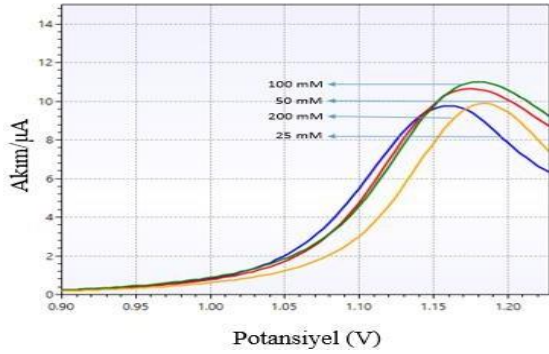
Hazırlanan biyosensörde kutupların bir ucu elektroda diğer ucu ise ölçüm hücresine daldırılarak sabitlendi ve Şekil 1'de görülen döngüsel voltammogram elde edildi. Biyoaktif tabaka için peroksidaz enzimi Au elektroda immobilize edildi. Ortama uygun miktarlarda eklenen H₂O₂ ve Fe₂(SO₄)₃ ile oksidasyon-reduksiyon pikleri elde edilerek çalışma aralığı belirlendi. Döngüsel voltammogramda alınan voltaj aralığı 0.2V – 1.4V (Şekil 1).



Şekil 1. Döngüsel voltammogram

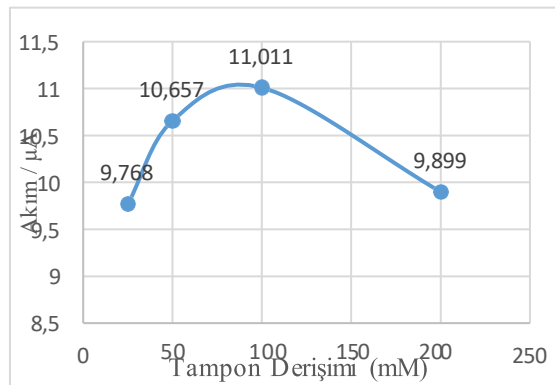
1 mg/mL hidrojen peroksidaz enzimi, 15 mg BSA, 67,5 mg Jelatin ve % 3 glutaraldehit ile hidrojen peroksit enzimi çapraz bağlanarak biyoaktif tabaka hazırlanmıştır. Daha sonra hazırladığımız biyoaktif tabakaya sahip biyosensörler ile tampon derişimlerinin biyosensör yanıtı üzerine etkisinin saptanması için, farklı derişimlerdeki tamponlarla ölçümler gerçekleştirildi. Bu amaçla bir önceki çalışmada en uygun tampon sistemi olarak belirlenen asetat tamponundan pH'sı 6,0 olan 50 mM, 100

mM, 200 mM, derişimlerde tamponlar hazırlandı. Daha sonra bu tamponlardan sırası ile ölçüm hücresi içerisine 5 mL alınarak, her bir tampon için ayrı ayrı 200 µg/dL demir içeren FeSO₄ çözeltisi ile 10 g/dL H₂O₂ çözeltisinden 5'er µL sırası ile ilave edildi. Elde edilen yanıt akımı değerleri, tampon derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek optimum tampon derişimi gösterildi.



Şekil 2. Tampon derişiminin biyosensör yanıtı üzerine etkisini gösteren Linear Sweep gösterimi

Tampon konsantrasyonunun yanıt akımı üzerindeki etkisini araştırmak için 50, 100, 200, 300 ve 400 mM asetik asit tamponundan 5'er mL ölçüm hücresine koyularak ölçme işlemi gerçekleştirilmiş ve en iyi yanıt akımının 200 mM, olan asetik asit tamponunda olduğu belirlenmiştir (Şekil 2,3).



Şekil 3. Tampon derişimlerinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi.

200 mM'dan yüksek konsantrasyonlarda daha düşük yanıt akımlarının elde edilmesi, artan iyonik kuvvetin enzimin katalitik aktivitesini azaltması olarak düşünülebilir. Aynı zamanda 200 mM'dan düşük konsantrasyonlarda daha düşük yanıt akımlarının elde edilmeside, azalan

iyonik kuvvetin enzimin katalitik aktivitesini düşürmesi olarak değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

H₂O₂'in elektrokimyasal oksidasyonu için +0,6 V potansiyel uygulandığında, gözlenen pik enzimatik reaksiyon esnasında harcanan ferrik demir (Fe⁺³) miktarıyla orantılı olarak harcanan H₂O₂'den kaynaklanmaktadır. Enzimatik reaksiyon sonucunda harcanan H₂O₂ uygulanan potansiyelde aşağıdaki gösterilen reaksiyona göre yükseltgenmektedir. Böylece, H₂O₂'in oksidasyon akımının ölçülmesi esasına dayanarak ferrik demir (Fe⁺³) tayini yapılabilmektedir.

Bu biyosensörde yapılan çalışmalara bakıldığında aynı pH da hazırlanan tamponlarda dahi farklı derişimlerde ölçümlerde hatalı sonuçlara sebep olabileceği gözlemlendi.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Elektrokimyasal çalışmalarda tampon derişimi önemli bir etken iken çoğu çalışmada bu etken göz ardı edilebilmektedir. Bu çalışmada sadece doğru pH değerinde çalışmanın yeterli olmadığı aynı zamanda doğru derişimde çalışmanın önemi vurgulanmak istenmiştir.

Etik Kurul: -

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Finansal Destek: Bu çalışma herhangi kurum veya kuruluş tarafından desteklenmemiştir.

Conflict of Interest: authors declared no conflict of interest

Financial Support: This study was not supported by any institution or organization.

Ethical Approval: -

KAYNAKLAR

1. Wang, J.; Wang, D.; Hui, N., A low fouling electrochemical biosensor based on the zwitterionic polypeptide doped conducting polymer PEDOT for breast cancer marker BRCA1 detection. *Bioelectrochemistry* 2019, 136, 107595.
2. Sethuraman, V.; Muthuraja, P.; Anandha Raj, J.; Manisankar, P., A highly sensitive electrochemical biosensor for catechol using conducting polymer reduced graphene oxide-metal oxide enzyme modified electrode. *Biosens Bioelectron* 2016, 84, 112-9.
3. Kökbaş, U.; KAYRIN, L.; Abdullah, T. J. A. K. T. D., *Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları*. 2013, 22 (4), 499-513.
4. Zhao, Y.; Chu, B.; Fang, S.; Zhao, J.; Zhang, H.; Yu, K., Potential of vibrational spectroscopy for rapid and accurate determination of the hydrogen peroxide treatment of plant leaves. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2019, 230, 118048.

5. Lin, X.; Wang, Y.; Wang, L.; Lu, Y.; Li, J.; Lu, D.; Zhou, T.; Huang, Z.; Huang, J.; Huang, H.; Qiu, S.; Chen, R.; Lin, D.; Feng, S., Interference-free and high precision biosensor based on surface enhanced Raman spectroscopy integrated with surface molecularly imprinted polymer technology for tumor biomarker detection in human blood. *Biosens Bioelectron* 2019, 143, 111599.
6. Rafatmah, E.; Hemmateenejad, B., Colorimetric and visual determination of hydrogen peroxide and glucose by applying paper-based closed bipolar electrochemistry. *Mikrochim Acta* 2019, 186 (11), 684.
7. Lyublinskaya, O.; Antunes, F., Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H₂O₂ biosensor HyPer. *Redox Biol* 2019, 24, 101200.