

FARKLI BSA DERİŞİMLERİNDE HİDROJEN PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ

Ahmet İLHAN

Dr., Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, ahmetilhangenetik@hotmail.com,
Adana/Türkiye, 0000-0003-2896-6280

Umut KÖKBAŞ

Dr. Öğr. Üyesi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD,
umutkokbas@gmail.com, Nevşehir/Türkiye, 0000-0003-4028-3458

Levent KAYRIN

Prof. Dr., Girne Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, lkayrin@gmail.com,
Girne/KKTC, 0000-0002-8751-3129

Öz

Çapraz bağlı enzimler, serbest enzimlere göre belirli bir sıcaklıkta daha kararlı halde olurlar. Çok sayıda amin grubuna sahip olan sığır serum albumini (BSA) enzim kümeleri arasında güçlü bir bağlanma sağlayarak, biyoaktif tabakanın aktivitesi ve stabilitesinin artmasına yol açar. Enzim-BSA karışımı, glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcı bir madde ile kovalent bağlandıktan sonra daha kararlı hale gelir. HRP enzimi altın elektrot üzerine BSA, jelatin ve glutaraldehit ile birlikte UV ışık yardımıyla immobilize edildi. Her elektrot için 7,5 mg, 15 mg, 30mg ve 60 mg derişimlerde farklı BSA miktarları kullanılarak dört farklı elektrot hazırlanmıştır. Hazırlanan dört farklı elektrot kullanılarak, dört farklı ferröz demir analiti ile 16 kez elektrokimyasal ölçüm gerçekleştirilmiştir. Glutaraldehit enzime göre daha yüksek affinite gösterdiği BSA polimerine bağlanarak, HRP üzerindeki BSA'dan kaynaklanan sıkı kovalent çapraz bağları azaltmış ve enzim aktivitesinin devam etmesini sağlamıştır. Farklı BSA derişimlerinin, enzim aktivitesini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Enzimleri çapraz bağlamak amacıyla kullanılacak polimerlerin derişimi, elektrokimyasal çalışmalarda önemli bir etkidir.

Anahtar Kelimeler: BSA, Hidrojen peroksidaz, Elektrokimya.

HYDROGEN PEROXIDASE ENZYME ACTIVITY AT DIFFERENT CONCENTRATIONS OF BSA

Abstract

Cross-linked enzymes are more stable at a certain temperature than free enzymes. Bovine serum albumin (BSA), which has a large number of amine groups, provides a strong binding between enzyme aggregates, thus leading to increased activity and stability of the bioactive layer. The enzyme-BSA mixture becomes more stable after covalent bonding with a crosslinking agent such as glutaraldehyde. The HRP enzyme was immobilized on the gold electrode together with BSA, gelatin and glutaraldehyde with the help of UV light. Four different electrodes were prepared using different amounts of BSA at 7.5 mg, 15 mg, 30 mg and 60 mg concentrations for each electrode. Using four different electrodes prepared, 16 electrochemical measurements were performed with four different ferrous iron analytes. Glutaraldehyde binds to the BSA polymer, which has a higher affinity than the enzyme, reducing the tight covalent cross-links caused by BSA on the HRP and ensuring the continuation of the enzyme activity. It was observed that different BSA concentrations significantly affected the enzyme activity. The concentration of polymers to be used for crosslinking enzymes is an important factor in electrochemical studies.

Keywords: BSA, Hydrogen peroxidase, Electrochemistry.

1. GİRİŞ

Büyük miktarda su emen ve üç boyutlu yapıyı koruyan çapraz bağlı hidrojel ağları, elektrokimya testlerinden biyomedikal uygulamalara kadar uzanan çalışmalarda büyük öneme sahiptir (1,2). Doğal proteinler ve sentetik polimerler dahil olmak üzere birçok malzeme hidrojel hazırlamak için kullanılmıştır (3). Günümüzde kolajen ve jelatin içeren protein bazlı hidrojeller, çapraz bağlayıcı özelliğe sahip glutaraldehit veya suda çözünür karbodiimidler kullanılarak sentezlenmektedir. Bu proteinlerin ve bunlara dayalı üretilen hidrojellerin yanında, sığır serum albümini (BSA), insan serum albümini (HSA) ile bunlardan elde edilen hidrojeller de, düşük maliyeti, stabilitesi, ligand bağlama özellikleri ve yüksek çözünürlüğü nedeniyle tercih edilmektedir (4,5).

Glutaraldehit ile çapraz bağlı sığır serum albümin (BSA), biyoyumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle elektrokimya çalışmaları ile çok çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (6). Sığır serum albümin (BSA) genellikle oldukça gözenekli bir yapı, nispeten iyi hidrofilik özellik ve in vivo uygulamalar için yabancı cisim reaksiyonunu büyük ölçüde baskılayabilen gelişmiş biyoyumluluk sergilerler (7).

Çapraz bağlama yöntemi hemen hemen her enzim için uygulanabilen, birçok ekonomik ve çevresel faydaya sahip olan bir yöntemdir. İçerisinde enzim ve polimerlerin bulunduğu hidrojel, çapraz bağlama yöntemine uygun polimerler ile hazırlanır ise yüksek aktiviteye olanak sağlar (8).

En az iki reaktif uca sahip hidrojel polimerleri, enzim yüzeylerinin spesifik aminoasit gruplarına bağlanarak enzim moleküllerinin hidrojel içerisinde üç boyutlu yapısı bozulmadan bir arada kalmalarını sağlar (9). Çok sayıda amin grubuna sahip olan sığır serum albumini (BSA), enzim kümeleri arasında güçlü bir bağlanma sağlar, böylece hidrojel aktivitesi ve stabilitesinin artmasına yol açar (10).

Enzimler sadece glutaraldehit ile çapraz bağlandığında aktivitelerini tamamen kaybetmektedir. BSA, aktivite kaybını önlemek için glutaraldehit ile birlikte koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. BSA'nın moleküler ağırlığı enzimlerin moleküler ağırlığından genel olarak daha büyüktür. Böylece BSA çoğunlukla glutaraldehit ile bağ yapılarak, enzim üzerindeki glutaraldehit baskısını azalttığı daha önceki benzer çalışmalarda gösterilmiştir (11).

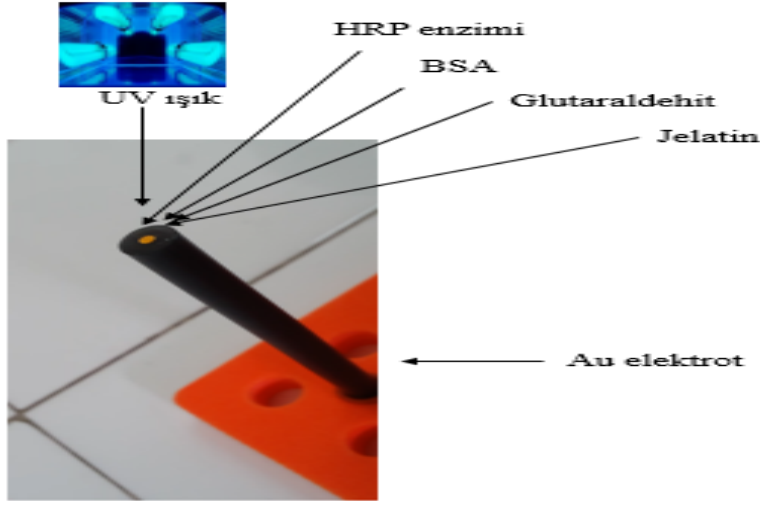
Çalışmamızda enzim aktivitesinin düşmemesi için BSA ve glutaraldehit çapraz bağlayıcıları birlikte kullanılmıştır. Ayrıca farklı BSA konsantrasyonlarında enzim aktivite değişimlerini göstermek için HRP (yaban turpu peroksidazı) enzim aktivitesinden yararlanılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Elektrodun Hazırlanması

Altın elektrot, kadifeye yüzey üzerine gama alümina solüsyonu damlatılarak temizlendi. Daha sonra distile su içerisinde durulanmadan önce sonikatör ve %96'lık etanolde 5-10 dakika bekletildi. Elektrot yüzeyi temizlendikten sonra 7,5 mg BSA ve 67,5 mg jelatin, pH'sı 6,0 ve derişimi 100 mM olan 300 µL asetat tamponu içerisinde çözülüp 35 °C'de 20 dakika bekletildi. Bu karışımın 10 µL'si, 10 µL daha önce hazırlanan 1 mg/mL derişimdeki HRP enzimi ile karıştırılarak elde edilen toplam hacim 20 µL olarak altın çalışma elektrodu üzerine yayıldı. Daha sonra altın elektrot üzerine 5 µL %3'lük glutaraldehit'in de eklenmesi ile hazır hale gelen immobilize tabaka 1 saat UV ışık altında bekletildi (Şekil 2.1.1).

Çalışmadaki amacımız elektrokimyada enzimlerin çapraz bağlanmasında çok sık kullanılan BSA'nın farklı derişimlerine, HRP enziminin verdiği katalitik tepkileri göstermektir. Bu nedenle diğer parametreler sabit tutulmak sureti ile aynı işlemler BSA'nın 15, 30 ve 60 mg derişimleri kullanılarak üç elektrot daha hazırlanmıştır. Böylece diğer bütün parametreler aynı tutularak, sadece 7,5; 15; 30 ve 60 mg BSA derişimlerinde dört farklı elektrot hazır hale getirilmiştir.



Şekil 2.1.1. Au elektrot üzerine HRP enziminin BSA, glutaraldehit ve jelatin ile beraber UV ışık kullanılarak immobilize edildiği gösterilmektedir.

UV ışık polimer yüzeylerde fotokimyasal olarak moleküllerin çapraz bağlanma reaksiyonlarını başlatır (12). Enerji deposu olan UV ışık HRP enziminin BSA ve glutaraldehit polimerine çapraz bağlanmasını hızlandırmış ve kolaylaştırmıştır. Ayrıca çalışmamızda yer alan jelatin bir hidrojeldir ve hidrojeller enzimlere uygun destek ortamları sağlayarak, enzimleri hareketsiz hale getiren en önemli biyomalzemedir (13).

2.2. Deneyin Yapılışı

Hazır hale getirilen Au elektrot, 5 mL, 100 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücre sine yerleştirildi. Daha sonra ölçüm hücresi içerisine ayarlanabilir mikro pipet ile 5 µL, 50 µg/dL ferröz demir (Fe^{+2}) ile 5 µL, 10 g/dL H_2O_2 arka arkaya ilave edilerek ölçüm yapıldı. Aynı işlemler elektrot tekrar hazır hale getirildikten sonra 100, 150 ve 200 µg/dL ferröz demir (Fe^{+2}) derişimi varlığında ve yine aynı şekilde her bir derişim için 5 µL, 10 g/dL H_2O_2 ilave edilerek tekrarlandı. Ölçümler termostatlı su banyosu kullanılarak 40 °C'de ve manyetik karıştırıcı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlemler 7,5; 15; 30 ve 60 mg BSA derişimlerinde dört farklı elektrot ile ve her bir elektrot için dört farklı 50, 100, 150 ve 200 µg/dL ferröz demir (Fe^{+2}) derişimi varlığında gerçekleştirilmiştir. Böylece toplam 16 kez ölçüm gerçekleştirilerek sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4)

Potentiostat (Düzenekte enzimin analite verdiği tepkiyi bilgisayar ekranına aktarır).

Au elektrotun yerleştirildiği ölçüm hücresi

Termostatlı su banyosu



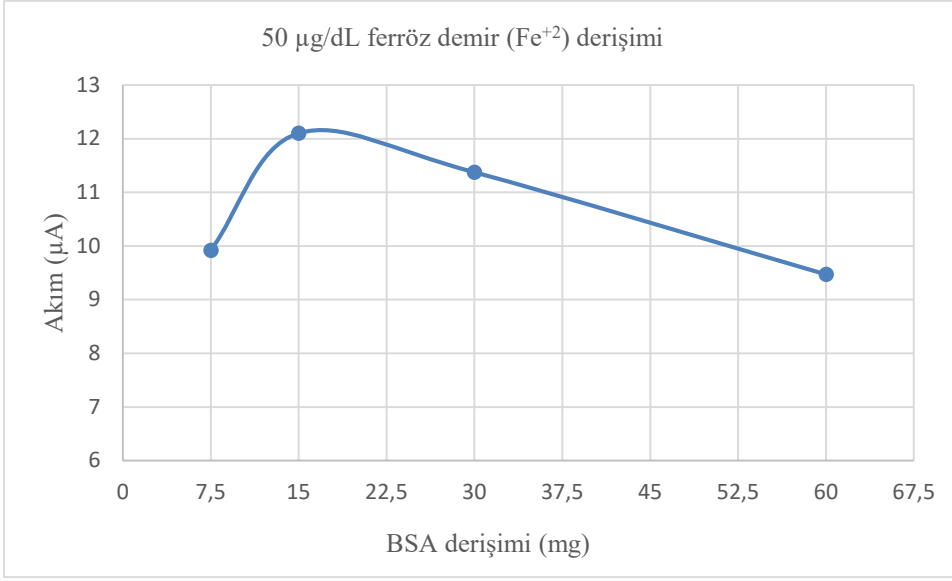
Şekil 2.2.1. Elektrokimyasal ölçümlerin yapıldığı düzenek.

İndirgenmenin meydana geleceği bir potansiyelde çalışıldığında, devreden geçen anodik akım arta kalan H_2O_2 derişimi ile doğru, Fe^{+2} derişimi ile ters orantılıdır. Fenton reaksiyonuna göre HRP enziminin katalizlediği tepkime ile ortamdaki Fe^{+2} miktarı kadar H_2O_2 kullanılır. Fenton reaksiyonu sonucunda arta kalan H_2O_2 derişimi ölçüldüğünde ters orantılı olarak başlangıçta kullanılan demir miktarı ölçülmüş olacaktır (14). Yapılan ölçümlerde tepkime sonunda arta kalan H_2O_2 derişimi palm sens marka potentiostat dönüştürücü ile bilgisayar ekranına aktarılmıştır (Şekil 2.2.1).

Bu şekilde elde edilecek olan veriler, farklı derişimdeki analite enzimin (elektrot yüzeyine farklı BSA derişimleri ile çapraz bağlı) vereceği katalitik aktiviteleri gösterecektir. Elde edilecek bu sonuçlar elektrokimyada ve klinik biyokimyada enzimlerin çapraz bağlanmasında kullanılan BSA'nın ve dolaylı olarak diğer çapraz bağlayıcı plimerlerin derişimlerinin belirlenmesinde seçici olunması gerektiğini ortaya koyacaktır.

3. BULGULAR

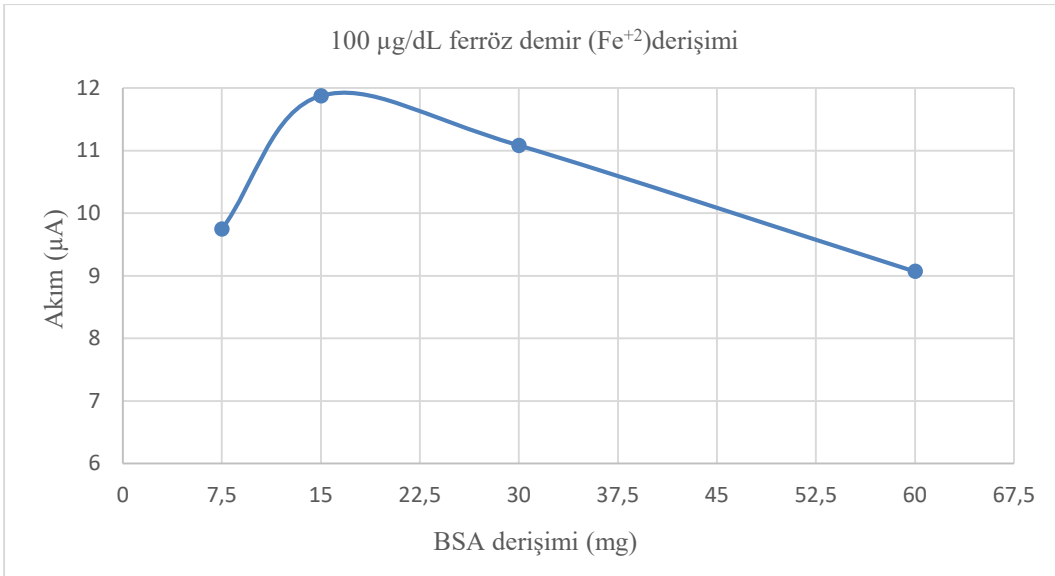
Sırasıyla 7,5; 15; 30 ve 60 mg derişimlerinde dört farklı BSA miktarlarıyla diğer parametreler sabit tutularak hazırladığımız elektrotlarımız ile, içersinde 100 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresine 50 $\mu g/dL$ ferröz demir (Fe^{+2}) ve 10 g/dL H_2O_2 ilave edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerden elde edilen değerler şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 50 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) derişiminde elde edilen enzim aktivite değerleri.

Şekil 3.1'deki grafik incelendiğinde 50 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) ve 10 g/dL H₂O₂ varlığında yapılan ölçümlerde en yüksek HRP enzim aktivitesi, 15 mg BSA derişiminin bulunduğu elektrot ile test edilmiştir.

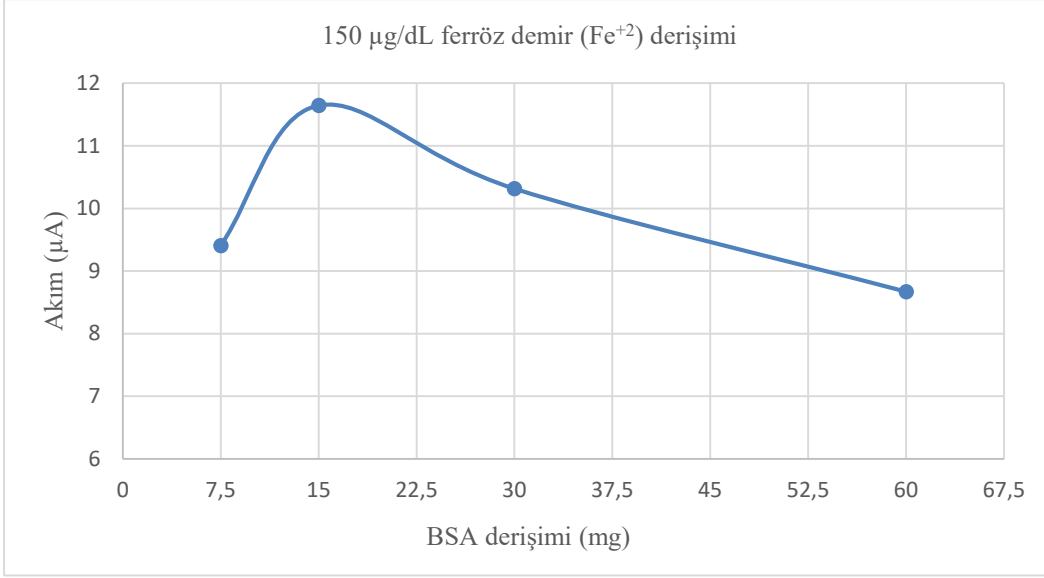
Sırasıyla 7,5; 15; 30 ve 60 mg derişimlerinde dört farklı BSA miktarlarıyla diğer parametreler sabit tutularak hazırladığımız elektrotlarımız ile, içerisinde 100 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresine 100 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) ve 10 g/dL H₂O₂ ilave edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu ölçülerden 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 aktivitesi, 15 mg BSA derişiminin bulunduğu elektrot ile test edilmiştir.

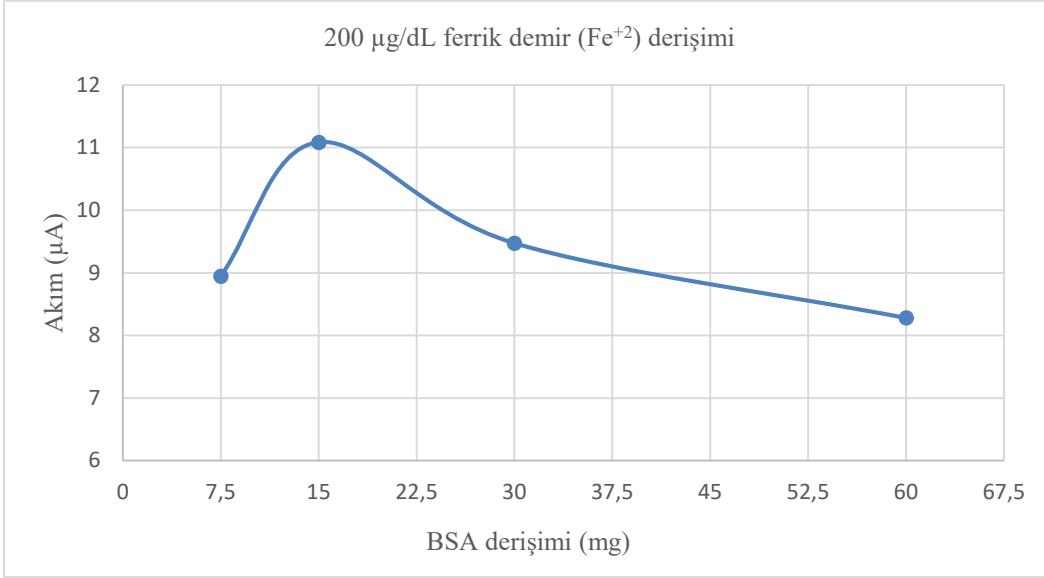
Sırasıyla 7,5; 15; 30 ve 60 mg derişimlerinde dört farklı BSA miktarlarıyla diğer parametreler sabit tutularak hazırladığımız elektrotlarımız ile, içersinde 100 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresine 150 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) ve 10 g/dL H₂O₂ ilave edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerden elde edilen değerler şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. 150 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) derişiminde elde edilen enzim aktivite değerleri.

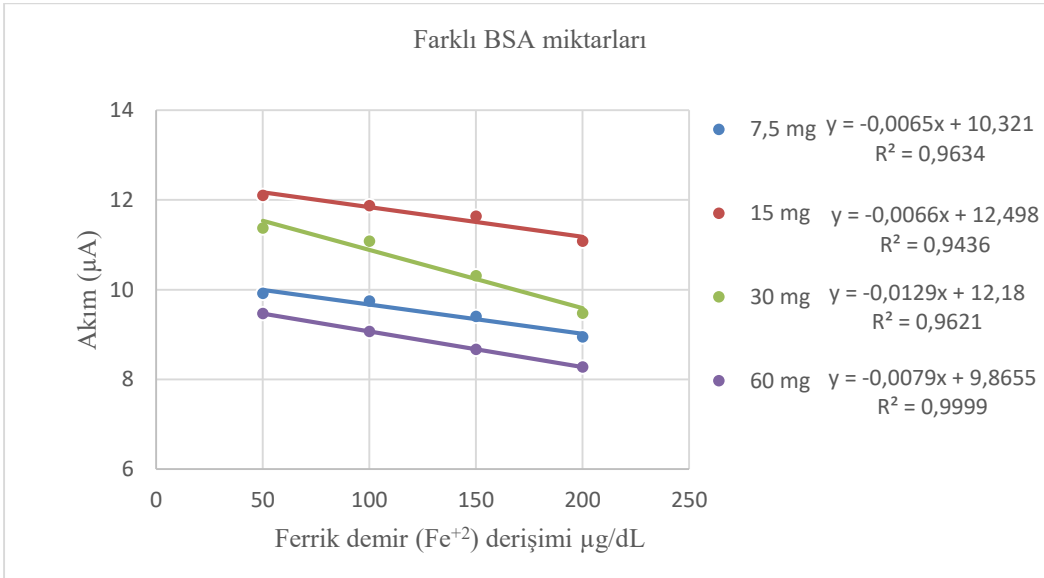
Şekil 3.3'deki grafik incelendiğinde 150 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) ve 10 g/dL H₂O₂ varlığında yapılan ölçümlerde en yüksek HRP enzim aktivitesi, 15 mg BSA derişiminin bulunduğu elektrot ile test edilmiştir.

Sırasıyla 7,5; 15; 30 ve 60 mg derişimlerinde dört farklı BSA miktarlarıyla diğer parametreler sabit tutularak hazırladığımız elektrotlarımız ile, içersinde 100 mM asetat tamponu bulunan ölçüm hücresine 200 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) 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 (Fe²⁺) derişiminde elde edilen enzim aktivite değerleri.

Şekil 3.4'deki grafik incelendiğinde 200 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) ve 10 g/dL H₂O₂ varlığında yapılan ölçümlerde en yüksek HRP enzim aktivitesi, 15 mg BSA derişiminin bulunduğu elektrot ile test edilmiştir.



Şekil 3.5. Farklı BSA derişimlerine bağlı olarak gerçekleşen enzim aktivite değerleri.

Sonuç olarak diğer parametreler sabit tutularak, 7,5; 15, 30 ve 60 mg BSA derişimlerinde hazırladığımız elektrotlar ile 50, 100, 150 ve 200 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) varlığında HRP enziminin katalitik aktivite değerleri Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, 50, 100, 150 ve 200 µg/dL ferröz demir (Fe²⁺) kullanılarak yapılan ölçümlerin tamamında optimum enzim aktivitesi 15 mg BSA derişiminin bulunduğu elektrot ile elde edilmiştir. 7,5 ve 30 mg BSA derişimlerinde HRP enzim aktivitesinin kısmen azaldığı, 60 mg BSA derişiminde HRP enzimi katalitik aktivitesinde daha fazla

bir düşüşün olduğu gözlenmiştir. 15 mg BSA derişiminden daha az veya daha yüksek derişimlerde, HRP enzim aktivitesinin azaldığı görülmektedir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elektrokimyasal çalışmalarda farklı BSA derişimlerinin enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için, 7,5; 15; 30 ve 60 mg derişimlerdeki BSA miktarları kullanılarak hazırlanmış elektrotlar ile her bir derişim için ayrı ölçme işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı BSA derişimlerinde HRP enzimi farklı katalitik aktivite göstermiştir. Optimum enzim aktivitesinin, derişimi 15 mg olan BSA derişiminde gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuçlar elektrokimyasal çalışmalarda diğer çapraz bağlayıcılarda olduğu gibi, BSA derişiminde enzim aktivitesi üzerinde önemli ölçüde etkili olduğunu göstermektedir.

Elektrokimya çalışmalarda BSA miktarı olması gereken derişimden fazla ise, enzim üzerindeki kovalent bağ sayısı artmakta ve böylece enzim aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Eğer BSA miktarı olması gereken derişimden düşük ise, içerisinde çapraz bağlı enziminde bulunduğu hidrojel stabilitesinin ve bunun sonucunda enzim aktivitesinin azalmasına neden olur. Bu çalışmada; enzimlerin çapraz bağlanmasında kullanılan BSA'nın farklı derişimlerinin enzim aktivitesi üzerine önemi test edilmiştir.

Özellikle klinik biyokimyada kan demiri, üre, glikoz ve kan gazları gibi hastalıkların teşhisi için yapılan enzimatik testlerin gelişiminde, enzimlerin çapraz bağlanmasında kullanılan BSA'nın derişimindeki farklılıkların önemi vurgulanmak istenmiştir. Hedef analiti doğru ve verimli bir şekilde ölçmek için, kullanılacak enzim doğru ve verimli katalitik aktivite göstermelidir. Elde edilen sonuçlara göre BSA miktarının değişmesi, enzim aktivitesinin artması ya da azalması ile sonuçlanmaktadır. Bu sonuçlar, elektrokimyada enzimleri çapraz bağlamak için kullanılacak olan en uygun BSA derişiminin önemini ayrıntılı bir şekilde ortaya koymaktadır.

KAYNAKÇA

1. Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A. & Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Adv Mater.* 18:1345–1360.
2. Shen, W., Lammertink, R. G. H., Sakata, J. K., Kornfield, J. A. & Tirrell, D. A. (2005). Assembly of an artificial protein hydrogel through leucine zipper aggregation and disulfide bond formation. *Macromolecules.* 38:3909–3916.
3. Park, J. H. & Bae, Y. H. (2002). Hydrogels based on poly (ethylene oxide) and poly (tetramethylene oxide) or poly (dimethyl siloxane): synthesis, characterization, *in vitro* protein adsorption and platelet adhesion. *Biomaterials.* 23:1797–1808.
4. Matsushita, S. et al. (2004). Functional analysis of recombinant human serum albumin domains for pharmaceutical applications. *Pharmaceutical research.* 21:1924–1932.
5. Ma, X. D. et al. (2016). A Biocompatible and Biodegradable Protein Hydrogel with Green and Red Autofluorescence: Preparation, Characterization and *In Vivo* Biodegradation Tracking and Modeling. *Sci Rep.* 6:19370.
6. Graiver, D., Durall, R. & Okada, T. (1993). Surface morphology and friction coefficient of various types of Foley catheter. *Biomaterials.* 14:465–469.
7. Risbud, M. V. & Bhonde, R. R. (2000). Polyacrylamide-chitosan hydrogels: *in vitro* biocompatibility and sustained antibiotic release studies. *Drug Delivery* 7:9–75.
8. Nadar, S.S., Muley, A.B., Ladole, M.R., & Joshi, P.U. (2016) Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of α -amylase. *Int J Biol Macromol.* 84:69-78
9. Magro, L.D., Hertz, P.F., Lafuente, R.F., Klein M.P., Rodrigues R.C., & Rodrigues R.C. 2016. Preparation and characterization of a combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification. *RSC Adv.* 32:26490-27259.
10. Shah, S., Sharma, A., & Gupta, M.N. (2006). Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Anal Biochem.* 351(2):207-213

11. Islan, G.A., Martinez, Y.N., Illanes. A., & Castro, G.R. (2014). Development of novel alginate lyase cross-linked aggregates for the oral treatment of cystic fibrosis. *RSC Adv.* 4(23):11758-11765.
12. McIntyre, S. N. & Walzak, M. J. (1995). New uv/ozone treatment improves adhesiveness of polymersurfaces, *Modern Plastics.* 72:79-83.
13. Pena, C., de la Caba, K., Eceiza, A., Ruseckaite, R. & Mondragon, I. (2010). Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresour Technol.* 101(17): 6836–6842.
14. Azevedo, A.M., Martins, V.C., Prazeres, D.M., Vojinovic, V., Cabral, J.M. & Fonseca, L.P. (2003). Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev.* 9: 199–247.