

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

ÇEVRE VE ENERJİ TEKNOLOJİLERİ YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

PROJE ADI: ATIK PEYNİR ALTI SUYUNDAN GENTİANA (*Gentiana lutea*) ÖZÜTÜ İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ BİYOPLASTİK ELDESİ

TAKIM ADI: BİYO-PLAS TEAM

TAKIM ID: T3-23629-161

TAKIM SEVİYESİ: Lise

DANIŞMAN ADI: TUBA KAYA

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Dünya nüfusunun hızla artışıyla çoğalan insan faaliyetleri günlük yaşantımızda kullanmış olduğumuz organik atıkların miktarını arttırmakta ve ekosisteme geri dönüşü zor olan izler bırakmaktadır. Yapılan çalışmalarla antioksidan aktivitesi yüksek biyobozunur plastiklere olan ilginin arttığını göstermektedir. Bu kapsamda yapılan literatür taramasının sonucunda Lactobacillus suşlarının ticari ve doğal olarak aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmadığından çalışmamızda PHB aktivitesini arttıran Lactobacillus suşları ticari ve atık peynir altı suyunda doğal olarak bulunan suşların *Gentiana lutea* özütü ile zenginleştirilerek biyoplastik eldesi amaçlanmıştır.

2. Problem/Sorun:

Günlük yaşantımızın vazgeçilmez parçası olan plastikler yıllarca doğada parçalanamadıklarından çevre kirliliğine neden olmaktadır. Her yıl yüzlerce ton plastik denizlerimizde ve okyanuslarda birikerek yaşayan canlı topluluğunu olumsuz etkilemekte ve ekosisteme büyük ölçüde zarar vermektedir. Çoğu plastik, çevre koşulları ne olursa olsun biyolojik olarak ayrıştırılamamaktadır. Maalesef bugüne kadar üretilen plastiğin yüzde 90'ı geri dönüştürülemedi. Greenpeace'in "Plastik Dolu Akdeniz" raporuna göre Akdeniz'den alınan derin deniz örneklerinin yüzde 92,8'inde plastik çıktı. Büyük plastik parçaları denizde ve okyanusta yaşayan tüm canlıların yaşamını tehlikeye atmaktadır.



3. Çözüm

Doğada mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla ayrıştırılamayan plastikler toprağa atık halinde karışarak ekosisteme zarar vermektedir. İnsana ve çevreye yararlı olan biyoplastikler günümüzde üzerinde çalışılan bir alan olup ilerlemektedir. Bu çalışma ile ekonomik biyoplastik üretimi hedeflenmektedir. Piyasada yapay antioksidan olarak kullanılan BHT ve BHA yerine doğal antioksidan aktivitesi yüksek olan *Gentiana lutea* (Gentiana lutea) bitkisinin özütü ile atık peynir altı suyundan Lactobacillus suşları kullanılarak biyoplastik elde edilmesi amaçlandı. *Gentiana lutea* bitkisi ile yapılacak biyoplastik eldesi ile hem raf ömrü uzun hem de çevreye yararlı ürünlerin üretilmesine öncülük edilmesi planlanmaktadır.

4. Yöntem

a. Soxhlet Ekstraksiyonu İle *Gentiana Lutea* Bitkinin Özütünü Çıkarma

Gentiana lutea bitkisinin kökü havanda dövülmüştür. Havanda öğütülen 20 gram *Gentiana* kök bitkisi 200 ml etanol içeren yuvarlak dipli balona koyulmuştur. Balon ısıtıcısı (Elektro-mag) ile kurulan düzenekte 8 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar 40°C'de su banyosunda uçurularak +4°C'de dolapta muhafaza edilmiştir.

b. Antioksidan Aktivite Tayini

Çalışmamızda kullanılan *Gentiana lutea* bitkisinin özütlerinden hazırladığımız 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 1,25 mg/mL olmak üzere beş farklı miktarda bitki özütü üzerinde çalışıldı. 0,08 g ekstrakt tartılarak 4 mL'ye metanolla tamamlandı. Hazırlanan örnek vorteks işlemine tabi tutulduktan sonra sırasıyla 10mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 1.25 mg/mL oranlarına seyreltildi. Her bir ekstrakt stoğundan 0,1 mL alınarak 3,9 mL DPPH çözeltisi eklenerek 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra spektrofotometrede UV ışımından geçirilerek bilgisayar kontrolünde 517 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

c. *Lactobacillus* suşlarının çoğaltılması

Ticari *Lactobacillus* suşlarının çoğaltılması amacıyla Mueller Hilton Broth kullanılmıştır. *Lactobacillus* suşları İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

d. Mueller Hilton Broth (MHB) Hazırlanışı

1 litre distile suya 34 g MHB tartılarak manyetik karıştırıcıla ısıtıcıda kaynatıldı. 121°C de 20 dakika otoklavda steril edildi. Sterilizasyon sonunda steril falkon ve tüpler içerisine *Lactobacillus* suşları eklendikten sonra çoğalmaları için 48 saat beklendi.

e. Biyoplastik Yapım Aşamaları

Mikroorganizmalar PHB sentezi için 100 mL besi ortamında 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir kültür 15 mL'lik falkonlara aktarılarak 5000 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüjlenmiş ve süpernatantları uzaklaştırılmıştır. Pelet, eşit hacimde karıştırılan etanol-aseton (1:1) karışımı içerisinde vorteksenerek yıkanmış ve tekrar 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet eşit hacimde %4 sodyum hipoklorik asit (çamaşır suyu) ile muamele edilerek oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Pelet tekrar eşit hacimde etanol-aseton (1:1) karışımı ile vorteksenerek yıkanmıştır. Devamında ise yine 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplerin ağzı yarı kapalı olacak şekilde 10 mL saf kloroform ile muamele edilmiş, su banyosunda sıcak kloroformda çözündürülmüştür ve buharlaştırılarak kloroform uzaklaştırılmıştır. Son olarak çözünmüş halde bulunan PHB buzdolabında 12 saat bekletilerek kurutulmuştur. Daha sonra toz haline getirilmiş ve kapaklı cam petrilere konularak oda sıcaklığında saklanmıştır. Oluşturulan LAC1, LAC2, LAC3 ve PAS1, PAS2, PAS3 gruplarının hassas terazide kuru ağırlıkları ölçülmüştür. 25 g nişasta, 250 ml saf su, 30 ml HCl (hidroklorik asit) ve 20 ml gliserin bir beherin içerisine konularak 15 dakika kaynatılmıştır. Oluşturulan karışım LAC1, LAC2, LAC3 ve PAS1, PAS2, PAS3 petrilere dökülmüştür. Daha sonra LAC1 ve PAS1 grupları kontrol değişkeni olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Projemizde amacımız ekosisteme büyük ölçüde zarar veren plastikler yerine geri dönüşüm işlemleri gerekmeyen ve biyolojik yollarla parçalanabilen, *Gentiana Lutea* bitkisinin antioksidan aktivitelerinden faydalanılarak atık peynir altı suyundan raf ömrü uzun biyoplastik üretimi gerçekleştirilmiştir.

Antioksidan Aktivite Bulguları

Çalışmamızda *Gentiana lutea* bitkisinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için DPPH yönteminden yararlanılmıştır. Buna göre bilinen en iyi antioksidan olan askorbik aside yakınlığı göz önüne alındığında *Gentiana lutea* bitkisinin yüksek antioksidan özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Biyoplastik Üretimi

Gentiana lutea bitkisinin kök kısmını kullanarak çıkardığımız özütün antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu askorbik aside olan yakınlığıyla kıyasladık. Ticari *Lactobacillus* suşları ve atık peynir altı suyundan doğal olarak elde edeceğimiz *Lactobacillus* suşlarını iki ayrı grup olarak belirledik. Her bir grup için üçer tane petri kutusu PAS1 ,PAS2, PAS3 (PAS: Peynir Altı suyu) ; LAC1, LAC2, LAC3 (LAC: *Lactobacillus*) olarak isimlendirildi. PAS1 ve LAC1 grupları kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. LAC2 ve PAS2 gruplarına 2 mL *Gentiana Lutea* özütü eklenmiştir. LAC3 ve PAS3 gruplarına ise 4 mL *Gentiana Lutea* özütü eklenmiştir. İlk ağırlıkları alınan örnekler etüvde kurutulduktan sonra tekrar hassas terazide ölçümleri alınarak kaydedilmiştir. Deney gruplarının farkını gözlemleyebilmek için su tutma kapasiteleri hesaplandı.

Su Alma Kapasitesi

Ticari olarak bulunan *Lactobacillus* suşlarına göre atık peynir altı suyunda bulunan *Lactobacillus* suşlarının su alma kapasitesini daha çok arttırdığı görülmektedir. Atık peynir altı suyunda ticari olarak bulunan suşlara karşı daha etkin plastikleşme gösterdiği su alma yüzdeleri üzerinden tespit edilmiştir. *Gentiane* özütleriyle zenginleştirilmiş antioksidan kapasitesi yüksek olan biyoplastik üretimiyle atık peynir altı suyundan geri dönüşüm işlemine gerek kalmadan biyolojik aktivite verimi yüksek olan ürün eldesi gerçekleştirilmiş oldu.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Ülkemizde her yıl yaklaşık 5 milyon ton peyniraltı suyu üretilmekte ve doğaya verilmektedir. Üretilen peyniraltı suyu gıda endüstrisinde kullanılmakta fakat büyük bir kısım doğaya atık olarak geri dönmektedir. Piyasada yenilebilir gıda ambalaj üretiminde çalışmalarına hız verilen biyoplastik giderek önem kazanmaya başlamıştır. Türk bilim insanı Prof. Dr. Sacide Alsoy Altinkaya ve ekibi yaptığı çalışmalar neticesinde peynir altı suyundan hem doğa hem insan sağlığını koruyacak yenilebilir ambalaj ürettiler. Proje fikrimiz literatürde yer alan projelerle benzerlik göstermesine karşın ayıran önemli bir nokta diğer projelerden çalışmamızı özgün kılmaktadır. Literatürde biyoplastiklerle ilgili yapılan bir çok çalışma olmasına rağmen ticari ve doğal *Lactobacillus* suşlarının aktivitelerinin karşılaştırıldığı ve *Gentiane lutea* bitkisi ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın alan yazına katkı sağlayacağı ve gelecek çalışmalara ışık tutacağı öngörülmektedir. Bitkisel kaynağımız olan *Gentiane lutea* cinsinin korunması ve yetiştirilmesi yolunda atılan adımları yeniden hızlandıracağımızı öngördüğümüz bu

proje fikrinde toplumumuzda sürdürülebilir tarım projeleri için bir alan açacağını düşünmekteyiz. Biyoplastiklerin eldesinde sentetik antioksidanların kullanımını maliyeti düşürdüğü için tercih edilmektedir. *Gentiana lutea* özütü ile hem doğal antioksidan kaynağı oluşturmuş hem de nesli tükenmekte olan bu türün yeniden üretimine arttırılması ve doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılmasını teşvik edilmesi planlanmıştır.

6. Uygulanabilirlik

Bu çalışma ile *Gentiana lutea* bitkisinin BHA işlevini doğal olarak karşıladığından ve atık peynir altı suyunun PHB üretimini doğal mikrobiyal yolla gerçekleştirmesiyle geri dönüşümü daha kolay olan biyoplastik üretiminin gerçekleştirilebileceği gösterilmiş oldu. Atık peynir altı suyundan *Gentiana lutea* özütü ile zenginleştirilmiş biyoplastik eldesi üniversitelerde, laboratuvarlarda mevcut ekipman ve malzeme ile üretilme imkanına sahiptir. Ayrıca daha gelişmiş şartlar olması dahilinde ticari bir ürüne dönüştürülerek seri üretimi yapılmasını öngörmekteyiz. Uygulanması durumunda herhangi bir risk teşkil etmeyeceğini doğaya ve insan sağlığına faydaları olacağını yapmış olduğumuz literatür taraması ile desteklemekteyiz.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Kullanılan Malzemeler

Çalışmamızda; distile su cihazı (elektro-mag), etüv (Ertick), otoklav (JKI), hassas terazi (Radwag), çeker ocak (Siemens), blender (Morphy Richards/700watt), santrifüj (Elektro.mag), spektrofotometre (Shimadzu uv-1800), manyetik ısıtıcılı karıştırıcı (Daihan Scientific), spatül, baget (isolab), petri kapları (IsoLab), filtre kağıdı (Whatman), mikro pipet (Isotherm), deney tüpleri (IsoLab), beher (Isotherm), santrifüj tüpü (IsoLab),soxhlet ekstraksiyon takımı(IsoLab),ve NaOH (Merck), metanol (Merck), HCl (Tekkim), gliserol (Balmumcu), askorbik asit (sigma-aldrich), DPPH (sigma-aldrich), kimyasal malzemeleri kullanıldı.

| İşin Tanımı | Mayıs | Haziran | Temmuz | Ağustos | Eylül | Ekim | Kasım | Aralık | Ocak |
|---------------------------------|-------|---------|--------|---------|-------|------|-------|--------|------|
| Literatür Taraması | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| Deneysel Çalışmalar | | | | * | * | * | * | * | |
| Verilerin Toplanması ve Analizi | | | * | * | * | * | * | * | |
| Proje Raporu Yazımı | | | | | * | * | * | * | * |

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Proje toplumun her kesiminden insanın kullanabileceği şekilde tasarlanmıştır. Çevre kirliliği genel bir sorun olmakla beraber bu sorunun çözümüne yönelik çalışmalar toplumun her kesimini ilgilendiren çalışmalardır. Günlük hayatta kullandığımız plastiklerin büyük çoğunluğu petrol bazlı olup geri dönüştürülemeyecek niteliktedir. Bu durum denizlerdeki ve okyanuslardaki plastik oranını arttırarak canlı yaşamını olumsuz etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda burada yaşayan canlıların plastikleri besin zannederek tüketmesi sonucunda bazı canlıların boğulmasına bazı canlıların ise midesinde plastik parçalarının birikimine yol açtığı gözlemlenmiştir. Bu proje fikri ile geri dönüştürülebilir biyoplastik üretimi ile hem doğa hem insan sağlığının korunması hedeflenmektedir.

9. Riskler

Projenin hayata geçirilmesi durumunda olası risk faktörleri çok fazla olmamakla beraber düşük ihtimalle gerçekleşebilecek durum ve alternatif planı şu şekildedir:

- *Gentiane lutea* bitkisine karşı immün sistemi düşük olan kişilerde alerji meydana gelmesi söz konusu olabilir. Bu durumda *Gentiane lutea* bitkisine alternatif olarak antioksidan farklı bir bitki özütü katılarak bu durumda olan kişiler için özel biyoplastik üretilmesi B planı olarak hazırlanmıştır.

10. Proje Ekibi

Takım Lideri:

| Adı Soyadı | Projedeki Görevi | Okul | Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi |
|--------------------|------------------|--------------------------|---|
| Tuba KAYA | Danışman | Bayrampaşa Bilim Merkezi | Biyoloji Öğretmeni/ 5 yıllık laboratuvar tecrübesi |
| Fatma Şevval YENER | Takım Lideri | Vefa Lisesi | Laboratuvar eğitime ortaokuldan beri devamlı, alana ilgili ve araştırmacı |
| Ebrar KURTULUŞ | Takım Üyesi | Pertevniyal Lisesi | Laboratuvar eğitime ortaokuldan beri devamlı, alana ilgili ve araştırmacı |

11. Kaynaklar

- 1-Olhan, E.,“Tarımsal Çevre Politikası”, A.Ü.Z.F. Tarım Ekonomisi Bölümü Ders Notları, Yayınlanmamış, 2004, Ankara
- 2-Saadettin,S.,Mercan,N.,Mumcu,Z.N. ve Beyatlı, Y.,2001,Bacillus cinsi bakterilerin poli-hidroksibütirat(PHB) üretim yeteneklerinin incelenmesi , biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi ,25,2.67-76
- 3-Luengo, J.M., Garcia. B., Sandoval, A., Naharro, G. ve Olivera , E.R.(2003).Bioplastics from microorganisms.Current Opinion in Microbiology,6:251-260.
- 4-Pritchard, N.M., 1978. Gentiana L. P. H. Davis (Ed.). Flora of Turkey and the East Aegean Islands (c. 6, s. 183-190). Edinburgh: University Press.
- 5-Mišić, D., Dragicevic, I., Grubišić, D., Culafic, L., 2001, In vitro Flowering Shoot Cultures of Marsh Gentian (*Gentiana pneumonanthe* L.), Propagation of Ornamental Plants, 1(1): 54-56.
- 6- Stahl W, Berg H, Arthur J et al. Bioavailability and metabolism. Mol Aspects Med 2002; 23: 39–100.
- 7- Akin EB, Karabulut I, Topcu A, Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. Food Chem 2008;107: 939–48.
- 8- Biyomedikal Cihaz Teknolojileri, Spektrofotometre cihazları, MEGEB, Ankara, 2011
- 9- Barnard and Sander 1989, Madison and Huisman 1999, Sudesh et al. 2000.
- 10- Baysak, İ.M., 2007, Bazı Rhizobium Türlerinin Polihidroksibütirat (PHB) Verimleri Üzerine Farklı Ortam Şartlarının Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- 11- Findlay, R. H. and White, D. C., 1983, Polymeric Beta-hydroxyalkanoates From Environmental Samples and *Bacillus megaterium* , Appl. Environ. Microbiol., 45, 1, 7178.
- 12- Slater, S. Gallaher, T., Dennis, D., 1992, Production of Polyhydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate in a Recombinant *Escherichia coli* Strain, Applied and Environmental Microbiology, 58, 4, 1089-1094.
13. Labuzek S., and Radecka, I., 2001, Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85, Journal of Applied Microbiology, 90, 353-357.
14. Ahn, W. S., Park, S. J., Lee, S. Y., 2000, Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fedbatch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution, Applied and Environmental Microbiology, 66, 8, 3624-3627.
15. <https://storage.googleapis.com/planet4-turkey-stateless/2020/05/1790a301-gp-2019-10.pdf>

EK 1: RESİMLER



Şekil 1: Gentiane Lutea Kök Kuru Örneği



Şekil 2: Soxhlet cihazı



Şekil 3: Antioksidan Aktivite Çalışmaları



Şekil 4: Lactobacillus suşlarının inkübasyonu



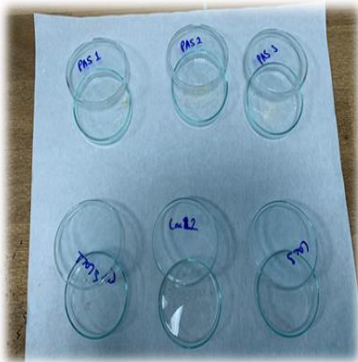
Şekil 5,6: Biyoplastik Eldesi Aşamaları



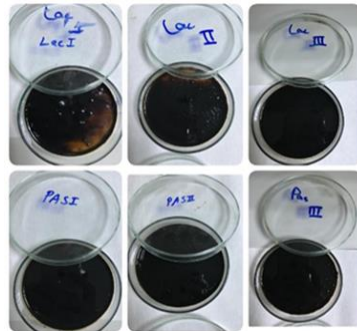
Şekil 7: Su Banyosunda Kloroformun Uçurulması



Şekil 8: Biyoplastiğin Etüvde Kurutulması



Şekil 9: Biyoplastik Kuru Örnekleri



Şekil 10: Biyoplastik Etüvde Kurtulmuş Son Durumları



Şekil 11: Su Alma Kapasitesi Çalışmaları