

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

PROJE KATEGORİSİ

PROJE ADI: Biyomoleküllerden sentezlenen hibrit nano yapıların filtre üzerinde fenol, m-krezol ve bisfenol A tayinleri için kullanılabilirliğinin araştırılması

TAKIM ADI: Filter biosensor

TAKIM ID: T3-14803-155

DANIŞMAN ADI: Doç. Dr. İsmail Öçsoy

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)	3
2. Problem/Sorun.....	4
3. Çözüm.....	4
4. Yöntem	4
5. Yenilikçi (İnovatif Yönü).....	5
6. Uygulanabilirlik.....	5
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	6
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar).....	6
9. Riskler	7
10. Proje Ekibi	7
11. Kaynaklar	7



1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Fenol ve türevleri pestisit, insektisit, plastik ve boya gibi ürünlerin üretiminde ortaya çıkan yan ürünlerdir ve insan ile çevreye olumsuz etkileri vardır. Özellikle bu kimyasalları içeren atık suları çevredeki su kirliliğinin önemli kaynağı olan endüstriyel atık sularının en tehlikelidir. O yüzden hızlı, pratik ve hassas bir şekilde analiz edilmeleri oldukça önem kazanmaktadır (1).

Nanoyapılı malzemelerin içerisine enzimlerin immobilize edildiği konseptler biyokatalizör, proteomik analizler ve sensörlerdeki potansiyel uygulamalarından dolayı oldukça dikkat çekmektedir (2). Teorik olarak enzim immobilizasyonu enzimlerin stabilitesini ve dayanıklılıklarını artırır ve enzimlerin etkili bir şekilde tekrar kullanılmasını sağlar. Son zamanlarda nanoporöz silika, nanofiber, manyetik nanoparçacıklar ve nanotüpler enzimlerin immobilizasyonunda substrat olarak önerilir (3). Genel olarak kovalent olmayan adsorpsiyon, kovalent konjugasyon ve çapraz bağlama enzim immobilizasyonunda kullanılan yaklaşımlardır (4). Bu yöntemler solüsyondaki serbest enzimlere kıyasla daha iyi stabilite sağlarken sentez proseslerinin sert koşullarda (yüksek sıcaklık, yüksek basınç ve toksik organik solventlerin kullanımı) olması aktivitelerini azaltır. Bu yüzden enzim gömülü nanomalzemelerin sentezi için basit ve etkili bir yaklaşım geliştirilmesi oldukça önem kazanmaktadır.

Son zamanlarda enzim-inorganik çiçek şekilli hibrid nanoyapılar serbest ve geleneksel olarak immobilize enzimlerle karşılaştırıldığında artan katalitik aktivite ve stabiliteye sahip olmalarından dolayı büyük ilgi görmektedir. Çiçek şekilli hibrid nanoyapıların aktivitesinin ve stabilitesinin artmasının sebebi, yüksek yüzey alanı, kütle-transfer limiti ve enzimlerin lokal konsantrasyonunun artmış olmasıdır. Çiçek şekilli hibrid nanoyapıların oluşumu protein/enzim iskelet yapısındaki amid grubu ve fosfat tamponu içerisindeki Cu^{+2} iyonları arasındaki kompleks oluşumuna dayanır. Cu^{+2} iyonları fosfat iyonları ile reaksiyona girerek $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ primer kristallerini oluşturur ve bu kristaller protein- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ komplekslerinin oluşumunda çekirdek görevi görür. Protein- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ kompleksinin büyümesiyle çok dallı çiçek şekilli hibrit nanoyapılar sentezlenir (5).

Araştırmacılar enzimlerin pahalı olmasından dolayı enzimatik yapıda olmayan organik moleküllerden peroksidaz benzeri aktivite gösteren çiçek şekilli nanoyapı sentezine odaklanmıştır. Son yıllarda enzim yada protein yapısında olmayan katekolaminler, biyoorganik moleküller ve bitki ekstraktlarından da çiçek şekilli hibrit nano yapılar sentezlenmiştir. Örneğin We ve arkadaşları 20 doğal amino asitten Cu^{+2} iyonlarıyla birlikte çiçek şekilli hibrit nanoyapıları sentezlemişler ve peroksidaz benzeri aktivite fonksiyonunu incelemişlerdir.

Bu projede, enzim yapısında olmayan biyomoleküllerin Cu^{+2} ve fosfat iyonları ile reaksiyonu sonucunda membran filtre üzerinde çiçek şekilli hibrit nano yapılar sentezlenmiş ve sentezlenen yapıların karakterizasyonu ve katalitik aktiviteleri sistematik olarak incelenmiştir. Sentezlenen bu yapıların katalitik aktivitesi sayesinde fenol, bisfenol A ve m-krezol gibi toksik su kirleticilerinin kısa sürede ve yüksek hassasiyette tayini için kolorimetrik biyosensör filtre sistemi geliştirilmiştir.

2. Problem/Sorun:

Mevcut durumda kirli sulardaki fenolik bileşiklerin analizi için kromatografi, elektroanaliz ve fluorometre gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler yüksek hassasiyete ve tekrarlanabilirliğe sahip olmasına rağmen pahalı cihazlardır ve analiz için fazla sarf malzeme ve uzman personel gerektirir. Bu durum, yöntemlerin kullanılabilirliğini sınırlandırır. Bu nedenlerden dolayı kirli sulardaki fenolik bileşiklerin tayini için hızlı cevap verebilen, kolay ve pratik bir yöntem geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur.

3. Çözüm

Kolorimetri görsel analize imkan tanıdığı için biyolojik bilimlerde ve analitik kimyada oldukça dikkat çekmektedir. Ayrıca basit, ucuz, hızlı ve özel cihazlar gerektirmeme gibi avantajları vardır. Fenolik bileşiklerin kolorimetrik tayini hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında 4-aminoantipirin (4-AAP) ve fenol arasında olan kromojenik reaksiyon sonucu elde edilen pembe renkli kinon yapılarının görsel analizi ile yapılır.

Biyomoleküllerden sentezlenen hibrit nano yapıların, katalitik aktiviteleri sayesinde kirli sularda bulunan fenolik bileşiklerin tayininde pratik, yüksek hassasiyetli ve maliyeti düşük olan kolorimetrik biyosensörlerde kullanılabileceği öngörülmüştür. Ayrıca hem kalitatif hem kantitatif analiz imkanı sunacağından dolayı birçok laboratuvara hitap edebilecek özellikte ve ihtiyaca çözüm niteliğindedir. Fabrikanın çevreye bıraktığı toksik maddenin tespitinde halihazırda kullanılan pahalı alet ve ekipmanlara göre oldukça avantajlı, ekonomik ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir.

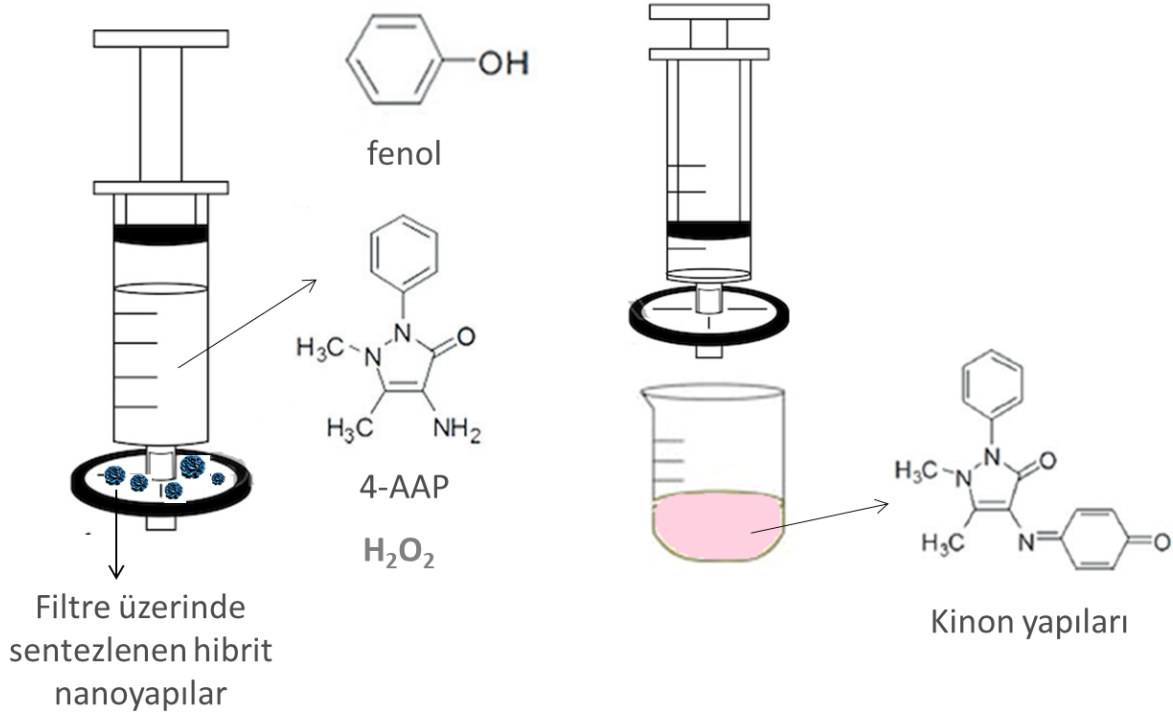
Projede biyomoleküllerin Cu^{+2} iyonu ve fosfat tamponu ile reaksiyonu sonucunda filtre membran üzerinde hibrit nano yapılar sentezlenmiştir. Ön denemelerden sentez süresinin 2 saat olduğu bilinmektedir. Cam tüp içerisinde hidrojen peroksit (H_2O_2), substrat olarak 4-Aminoantipirin (4-AAP) ve toksik düzeyde su kirleticisi olan numune karışımı hazırlanacak ve enjektöre çekilen karışım üstten filtreye verilecektir. 15 dakika sonunda filtre sisteminden alınan ve pembe renk gözlenen çözeltide toksik düzeyde su kirleticisi varlığı kolorimetrik olarak tayin edilecektir. Aynı zamanda alınan ürünün UV-Vis spektrofotometrede 505 nm de absorbansı okunarak kantitatif olarak analizi yapılacaktır.

4. Yöntem

Öncelikle membran üzerinde çiçek şekilli hibrit nanoyapılar sentezlendi. Bunun için beher içinde belli konsantrasyonlarda biyomolekül (gallik asit vb) (0.02 mg/mL) distile suda çözüldü ve $CuSO_4$ çözeltisi (0.08 mM) ile karıştırıldı. Filtre mebran üzerine emdirilerek 2 saat bekletildi ve ardından kurutuldu. 2 saat sonunda Taramalı Elektron Mikroskobundan alınan sonuçlara göre hibrit nanoyapıların sentezlendiği gözlemlendi.

Cam tüp içerisinde son hacmi 3 mL olacak şekilde 4 mM 4-AAP, 1 mM H_2O_2 , pH 7,4 fosfat tamponu ve toksik düzeyde su kirleticisi olan numunelerin karışımları hazırlandı. Enjektöre çekilen solüsyon üstten filtreye verildi ve 15 dakika sonrasında biyosensör filtre sisteminden

alınan ve pembe renk gözlenen çözeltide toksik düzeyde su kirleticisi varlığı kolorimetrik olarak tayin edildi. Toksik madde miktarı UV spektrofotometrede 505 nm’de absorpsansı okunarak belirlendi.



Şekil 1. Fenolik bileşiklerin filtre membran üzerinde kolorimetrik tayini

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Çiçek şekilli hibrit nanoyapılar katalitik aktivitelerinden dolayı son zamanlarda oldukça popüler olup genelde çözelti ortamında 72 saatte sentezlenmektedir. Filtre membran üzerinde ise 2 saatte sentezlenebilmektedir. Sentez süresinin 72 saatten 2 saate düşmesindeki temel mekanizma Cu₃(PO₄)₂ kristallerinin katı yüzey üzerinde daha hızlı oluşması ve devamında yapıya girecek temel molekülle kristaller arasındaki etkileşim ve büyüme aşamasının da daha kısa sürede gerçekleşmesidir. Bu anlamda projenin yenilikçi olduğu düşünülmektedir.

Günümüzde fenolik bileşiklerin kolorimetrik tayini 4-AAP ile fenol yapılarının enzimatik reaksiyonu sonucu çözelti ortamında yapılmaktadır. Ancak filtre üzerinde hibrit nanoyapıların katalitik aktivitesi sayesinde reaksiyonun gerçekleşmesi ve enzim yerine maliyeti daha ucuz olan hibrit nanoyapıların kullanılması bakımından günümüzde kullanılan tekniklere göre oldukça yenilikçi olduğu düşünülmektedir.

6. Uygulanabilirlik

Üzerinde hibrit nanoyapıların sentezlendiği filtre membranlar kullanılabilir durumdadır. Projemiz uygulanabilir haldedir. Birçok kez denemeler yapılmış ve sonuçlar alınmıştır.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.

Projede Kullanılacak Malzemeler:

Enjektör
 Şırınga filtresi (Selüloz asetat, 0.45 µm)
 Biyomolekül (Gallik asit vb.)
 Bakır sülfat pentahidrat
 4-Aminoantipirin
 Hidrojen peroksit
 Cam vial

Malzemeler	Yaklaşık maliyet
Enjektör	50 TL/100 adet
Şırınga filtresi	500 TL/100 adet
Bakır sülfat pentahidrat	500 TL/250 g
4-Aminoantipirin	1500 TL/250 g
Hidrojen peroksit	50 TL/1 litre
Cam vial	400 TL/100 adet

Yukarıda yaklaşık maliyeti verilen kimyasallar, fenolik bileşiklerin tayininde çok az miktarlarda kullanıldığı için projenin maliyeti oldukça düşüktür.

Projenin iş zaman planı:

No	Adı/Tanımı	Kim(ler) Tarafından Yapılacağı	AYLAR													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	Gerekli kimyasalların ve malzemelerin alınması. var olan malzemeler ile ön deneylerin yapılması	Danışman Öğrenci														
2	Farklı şekil ve boyuttaki hibrit nano yapıların membran filtre üzerinde sentezi	Öğrenci														
3	Fenol, m-krezol, bisfenol-A tayinlerinin yapılması	Öğrenci														

8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar):

Üretim tekniklerinin ekonomik, pratik ve hızlı entegre edilebilir olmasından dolayı endüstriyel alanda ciddi talep göreceği öngörülmektedir. Alet, ekipman ve uzman personel ihtiyacı en aza

indireceğinden dolayı ciddi katma değere sahip olacağı planlanmaktadır. Atık su analizi yapan laboratuvarlarda iş yükünü ve pahalı cihazlara ihtiyacı azaltacağı için yatırımcı firmalar tarafından üretimi desteklenecektir.

9. Riskler

Kirli sularda bulunan çok düşük konsantrasyonlardaki fenolik bileşiklerin tayininde filtre üzerinde sentezlenen hibrit nanoyapıların miktarı yeterli olmayabilir. Bu durumda yüksek konsantrasyonda hibrit nanoyapılar sentezlemek gerekecektir. Ayrıca çok düşük konsantrasyonlarda fenolik bileşik varlığında reaksiyon sonucu elde edilen rengin şiddeti gözle ayırt edilemeyecek kadar açık renkte olabilir. Bu durumda fenolik bileşik varlığı UV-Vis spektrofotometre kullanılarak tayin edilir. Filtre üzerinde hibrit nanoyapıların morfolojisi ortamın pH ı ile direkt alakalı olduğu için ortamın pH ı kontrol edilerek sentez yapılmalıdır.

10. Proje Ekibi

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Doç. Dr. İsmail Öçsoy	Danışman	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Proje önderi, proje tasarımcısı
Şeyma Dadı	Öğrenci	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Deneyleyi yapan kişi

11. Kaynaklar

- (1) Alkasir, R.; Ornatska, M.; Andreescu, S. Colorimetric Paper Bioassay for the Detection of Phenolic Compounds. *Anal. Chem.* 2012, 84, 9729-9737.
- (2) Chiu, C. Y.; Li, Y.; Ruan, L.; Ye, X.; Murray, C. B.; Huang, Y. Platinum Nanocrystals Selectively Shaped Using Facet-Specific Peptide Sequences. *Nat. Chem.* 2011, 3, 393-399.
- (3) Temperature-Responsive Enzyme-Polymer Nanoconjugates with Enhanced Catalytic Activities in Organic Media. *Chem. Commun.* 2013, 49, 6090-6092.
- (4) Lee, C. H.; Lin, T. S.; Mou, C. Y. Mesoporous Materials for Encapsulating Enzymes. *Nano Today* 2009, 4, 165-179.
- (5) Celik, C.; Ildiz N.; Ocsoy I. Building block and rapid synthesis of catecholamines-inorganic nanoflowers with their peroxidase-mimicking and antimicrobial activities. *Sci Rep.* 2020, 10, 2903-2020.

