

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**PROTEİN-MEMBRAN ETKİLEŞİMLERİ ve PROTEİNLERİN MEMBRAN  
SİSTEMLERLE AYIRILMASI**

**SEMA ELMAS SALGIN**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**ANKARA**

**2004**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Doktora Tezi

### PROTEİN-MEMBRAN ETKİLEŞİMLERİ ve PROTEİNLERİN MEMBRAN SİSTEMLERLE AYIRILMASI

Sema SALGIN

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof.Dr.Serpil TAKAÇ

Eş Danışman: Prof.Dr.Tunçer H. ÖZDAMAR

Model protein bovin serum albümin (BSA) ve model enzim serin alkali proteaz (SAP) ile farklı kimyasal yapı (polietersülfon, PES; selüloz triasetat, CTA) ve farklı molekül ağırlığı tutma değerinde (MWCO=10 ve 100kDa) membranlar kullanılarak çeşitli iyonik çevrelerde protein-membran etkileşimleri sistematik ve kapsamlı bir şekilde moleküler seviyede incelenmiş; membran kirliliğinin kantitatif bir ölçütü olarak membranlarda BSA ve SAP için etkin difüzyon katsayıları belirlenmiştir. Proteinlerin izoelektrik noktasında (pI), izoelektrik noktasının altında ve üzerindeki pH (BSA için 3.78, 4.78(pI), 6.80; SAP için 7.14, 9.08 (pI), 11.06) değerlerinde, farklı iyonik gerilim değerlerinde (BSA için KCl ile, SAP için fermentasyon ortamında bulunan  $(NH_4)_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ - $NaH_2PO_4$ ,  $CaCl_2$  gibi farklı tuzlar ile sağlanan iyonik gerilimlerde) ve farklı kimyasal yapı ve MWCO değerinde membranlar (BSA için 10kDa ve, 100kDa PES, 10kDa CTA; SAP için 100kDa PES) ile statik adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Proteinler, hidrofob yapıdaki PES membranlara hidrofob etkileşimler nedeniyle, hidrofil yapıdaki CTA membranlara kıyasla daha çok adsorplanmışlardır. BSA'nın membranlara adsorpsiyonunun Freundlich izotermine, SAP'ın ise lineer adsorpsiyon izotermine uyduğu, BSA ve SAP'ın pI'da adsorpsiyonun diğer pH değerlerine göre daha az olduğu, en fazla adsorpsiyonun pI'nın altında meydana geldiği belirlenmiş; iyonik gerilimin artması ile membran kirliliğinin azaldığı gözlenmiştir. SAP'ın PES membranlara adsorpsiyonunda iyonların davranışları Hofmeister serilerine uygunluk göstermiş; proteinlerin çözünürlüğünü azaltan anyonların membranlara adsorpsiyonu arttırdığı belirlenmiştir. Akım potansiyeli ölçüm yöntemine göre deneysel olarak membranların, teorik olarak da proteinlerin -adsorpsiyonunun incelendiği her iyonik çevrede- yüzey yükünün bir ölçüsü olan zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Çalışılan tüm koşullarda membran zeta potansiyellerinin negatif olduğu, pH'ın artması ile zeta potansiyellerinin mutlak değerlerinin arttığı, iyonik gerilimin artması ile de azaldığı belirlenmiştir. Proteinlerin zeta potansiyellerinin ise pI'nın altında pozitif, pI'nın üstünde negatif yüklü ve pI'da en düşük değerde olduğu belirlenmiştir. Bulunan zeta potansiyelleri yardımıyla elektrostatik etkileşim enerjileri ile van der Waals enerjileri hesaplanmış ve adsorpsiyonda etkin olan itme ve çekme enerjileri DLVO teorisi ile belirlenmiştir. Adsorpsiyonun en az olduğu pI'da çekme kuvvetleri baskın ve küçük bir değer iken, adsorpsiyonun fazla olduğu pI'nın altındaki değerlerde çekme kuvvetleri baskın ve yüksektir. pI'nın üzerinde ise itme kuvvetleri etkindir. Protein-membran etkileşimleri sonucu membran yüzeyinde meydana gelen değişimler FTIR-ATR analizleri ile belirlenmiş ve membran yüzeyinde protein adsorpsiyonunun bir göstergesi olan amid I bandı şiddetinin adsorpsiyonun fazla olduğu pH değerinde fazla, en az olduğu pH'da ise az olduğu gözlenmiştir. Membran yüzeyindeki değişimler SEM ve AFM analizleriyle de incelenerek sonuçların adsorpsiyon verileriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Proteinlerin membrandaki etkin difüzyon katsayısı (De) deneysel olarak tasarlanan sistemde alınan verilerin model sonuçları ile uyumu ile belirlenerek, iyonik çevre ile değişimi incelenmiş ve kirliliğin fazla olduğu pI'nın altındaki pH değerinde De'nin düşük, adsorpsiyonun az olduğu pI'da ise yüksek olduğu ve iyonik gerilimin artması ile arttığı belirlenmiştir.

2004, 178 sayfa

**ANAHTAR KELİMELER :** Protein-membran etkileşimleri, membran kirliliği, protein adsorpsiyonu, ara yüzey etkileşimleri, iyonik çevre, DLVO teorisi, etkin difüzyon katsayısı

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### PROTEIN-MEMBRANE INTERACTIONS AND SEPARATION OF PROTEINS BY MEANS OF MEMBRANE SYSTEM

Sema SALGIN

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Serpil TAKAÇ  
Co-Supervisor: Prof.Dr.Tunçer H. ÖZDAMAR

Protein-membrane interactions were studied comprehensively using the model protein bovine serum albumin (BSA), the model enzyme serine alkaline protease (SAP), and the ultrafiltration membranes with different chemical structures (polyethersulphone, PES; cellulose triacetate, CTA) and with different MWCO values (10 and 100 kDa) at various ionic environments. The effective diffusion coefficients for BSA and SAP, being the quantitative measure of the membrane fouling, were determined. Static adsorption experiments were carried out at the isoelectric point (IEP), under the IEP and above the IEP of the proteins ( $pH= 3.78, 4.78(pI), 6.80$  for BSA;  $pH=7.14, 9.08 (pI), 11.06$  for SAP) for different ionic strength values ( $0.01$  and  $0.1M$  with KCl for BSA;  $0.218-0.484M$  with the salts of the fermentation medium, i.e., with  $(NH_4)_2HPO_4, KH_2PO_4, Na_2HPO_4-NaH_2PO_4, CaCl_2$  for SAP) by using the membranes of different MWCO values ( $10kDa, 100kDa$  PES and  $10kDa$  CTA for BSA;  $100kDa$  PES for SAP). More BSA was adsorbed on hydrophobic PES membranes than on hydrophilic CTA membranes due to the hydrophobic interactions. Isotherms for the BSA adsorption on both types of membranes were correlated by the Freundlich equation; however, those for the SAP adsorption were correlated by the linear adsorption models. The highest degree of adsorption was obtained under the IEP of the proteins whereas the minimum adsorption was occurred at the IEP. With increasing ionic strength, the amount of the adsorbed protein decreased. SAP adsorption on PES membranes agreed well the Hofmeister series of the ions; i.e. the anions, which decrease in solubility of proteins, increased the extent of adsorption. The zeta-potentials for the membranes and for BSA were determined by streaming potential measurements and theoretical calculations, respectively. It was found that PES and CTA membranes were both negatively charged under all the experimental conditions applied. The values of the zeta potential of the membranes increased with increasing pH, however, decreased with increasing ionic strength. The electrostatic and the van der Waals interactions energies between the membranes and BSA were calculated using the DLVO theory. Attractive forces under the IEP, however, repulsive forces above the IEP were found to be dominant. To detect the structural changes on the PES and CTA membrane surfaces occurred due to the adsorption, the membranes were analysed by FTIR-ATR measurements. The amide I band absorbance intensity was observed in proportion with the amount of adsorbed protein on the membrane surfaces. The SEM and AFM images of the membranes also revealed that the adsorption data agreed well with the changes occurred on the membrane surfaces due to the membrane fouling. The effective diffusion coefficients for BSA and SAP into the PES membranes were calculated by employing the experimental data -obtained at different pH and ionic strength values- into the model, which is constructed on the basis of the mass balance in the porous membranes. It was found that the diffusivity of the proteins was higher at the IEP than that of under the IEP; and the increase in ionic strength increased the diffusivity.

2004, 178 pages

**Key Words :** Protein-membrane interactions membrane fouling, protein adsorption, interface interactions, ionic environment, DLVO theory, effective diffusion coefficient

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

“Protein Membran Etkileşimleri ve Proteinlerin Membran Sistemlerle Ayırılması” başlıklı doktora tez önerisi için Tez İzleme Komitesinin (TİK) oluşturulması ile aktif lisans üstü Doktora çalışmalarına Haziran 2001’de başladım. Bu tarihten önce, Eylül 1998 – Eylül 1999 tarihleri arasında, Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Lisans ve Lisansüstü Araştırma Laboratuvarlarında yer alabilecek cihaz ve ekipmanların; satın alma, montaj ve ilk işletim süreçlerinde aktif olarak görevlendirildim. Araştırma laboratuvarlarının oluşturulabilmesi için 25 Kasım 1999’de alınan 1.5 milyon \$’lık DPT ödeneğinin tüm zorluklara karşın 31 Aralık 1999 tarihine kadar çok kısa bir sürede harcanarak başarı ile satın alımların gerçekleştirilmesinde ve bu sayede genç araştırmacılar için modern bir araştırma alt yapısı oluşturulmasında etkin rol aldım.

Şubat 1999’da geçici kadrom ile birlikte 2547 sayılı kanunun 35. maddesi gereğince görevlendirildiğim halde bu görevlendirilmenin gerçekleşmesine izin verilmemesi, doktora çalışmalarımın aksamasına sebep oldu. Doktora öğrenimimi tamamlamak için Kasım 2000’de Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne 2547 sayılı kanunun 35. maddesi gereğince görevlendirilerek Ankara’ya geldim. Bu tarihten sonra doktora programım yoğun bir şekilde devam ederek bitirme aşamasına ulaştı.

Özel öğrenci olarak Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği dersini aldıktan sonra kendisi ile Yüksek Lisans yapmaya karar verdiğim ve o andan itibaren uzunca bir yolu beraber yürüdüğüm, bugüne kadar çalışmalarında karşılaştığım güçlüklerle pozitif bir enerji ve sabırla sistematik bir şekilde yaklaşmamı sağlayan, akademik düşünce ve ilkelere sahip bir bilim insanı olarak yetişmemde bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serpil TAKAÇ’a verdiği destek için çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımın sorunsuz bir şekilde devamı için Biyokimya Mühendisliği, Kinetik ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarlarındaki olanaklarından yararlandığım; bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan, doktora tez izleme komitesi toplantılarında da değerli görüşlerinden yararlandığım Eş Danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Tunçer ÖZDAMAR’a ve Sayın Prof. Dr. Güzide ÇALIK’a teşekkür ederim. Ayrıca fermentasyon ile üretilmiş SAP enzimini sağlayarak çalışmalarına katkıda bulunan ve hiçbir konuda yardımını esirgemeyen Sayın Doç.Dr.Pınar ÇALIK’a teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarım süresince laboratuvarları paylaştığım ve fikir alış verişinde bulunarak her konuda tartışma imkanı bulduğum arkadaşlarım Dr.İlknur Şenver ÖZÇELİK ve KYM Nermin KALENDER’e teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince Ocak ve Temmuz aylarında yoğun programından zaman ayırarak tez çalışmalarımın değerlendirilmesi için gerçekleştirilen TİK toplantılarımızda değerli fikir ve görüşlerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. İsmail TOSUN’a çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmam kapsamında yer alan membranların elektrokinetik özelliklerinin belirlenmesi için gerekli olan Ag/AgCl elektrodların yapımında laboratuvar imkanlarını ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Adnan KENAR'a; etkin difüzyon katsayısının bulunması için kurulan modelin çözümünde yardımını esirgemeyen Doç.Dr.Burhanettin ÇİÇEK'e teşekkür ederim. Ayrıca membranların yüzey karakterizasyonları için gerekli FTIR'nin ATR ünitesi laboratuvarımıza satın alınana kadar deney sonuçlarını değerlendirebilmem için bu analizlerin yapılmasını sağlayan TETRA A.Ş'den Gürsel ULUTUNCEL'e ve analizlerin yapıldığı ORS'ye verdikleri imkan için çok teşekkür ederim.

Doktora tez projesinin başarı ile yürütülmesinde katkılarından dolayı; TÜBİTAK'a (Protein ve Enzimlerin Ultrafiltrasyon Membranlarla Ayrılmasında Protein-Membran Etkileşimleri, Proje No: *MİSAG* 225) ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Protein ve Enzimlerin Ultrafiltrasyon Membran ile Ayrılma Performansına Çözelti ve Membran Özelliklerinin Etkisi, Proje No: 2001-07-05-061) teşekkür ederim.

Zor anlarımda bulduğu pratik çözümlerle beni rahatlatan, her türlü sıkıntı ve sevincimi paylaştığım ve her konuda desteğini gördüğüm, Sivas'dan beraber yola çıktığımız değerli eşim Arş.Gör.Uğur SALGIN'a verdiği destek, gösterdiği sabır ve sevgi için teşekkür ederim.

Tez projemin yoğun bir biçimde devam ettiği dönemlerde, gerçek dünyada ilk tanışmamızın randevusu olan 13 Şubat 2003 tarihinden itibaren varlığı ile beni daha da güçlü kılan, rahatlatan, sevindiren ve aynı zamanda yoran, çok hızlı büyüyen ve yeterli zaman ayıramadığım için hep üzüntü duyduğum fakat her anı dolu dolu yaşadığımız ve şimdi uyurken bile horlamasıyla bana huzur veren sevgili oğlum küçük dev adam Yiğit Efe SALGIN'a benimle birlikte olduğu için teşekkür ederim.

Bu doktora tez projesinin gelişim sürecinde her zaman kendilerinden yoğun destek aldığım, ancak kendilerine yeterli ilgi ve zamanı ayıramama rağmen hiçbir serzenişte bulunmayan sevgili annem Hikmet ELMAS ve babam Bayram ELMAS'a, özellikle küçük Yiğit doğduktan sonra son bir yılı birlikte paylaştığımız kayınvalidem Bahtışen SALGIN ve kayınpederim Yücel SALGIN'a verdikleri destek için, ayrıca diğer tüm aile bireylerine de anlayışları için çok teşekkür ederim.

Sema ELMAS SALGIN  
Ankara, Temmuz 2004

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xviii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	7
2.1. Membran Prosesleri .....	7
2.2. Membranlar .....	11
2.2.1. PES membranlar .....	16
2.2.2. CTA membranlar .....	17
2.3. Proteinler .....	19
2.4. Protein-Membran Etkileşimleri.....	25
2.4.1. Adsorpsiyon .....	27
2.4.1.1. Elektrostatik etkileşimler .....	28
2.4.1.2. van der Waals kuvvetleri.....	33
2.4.1.3. Ara yüzey etkileşim enerjilerinin hesaplanması: DLVO teorisi .....	34
2.4.1.4. Hidrofobik kuvvetler .....	35
2.4.2. Agregasyon .....	36
2.4. Membran Kirliliğine Etki Eden Parametreler .....	38
3. MEMBRANDA ETKİN DİFÜZYON KATSAYISININ BELİRLENMESİ.....	47
3.1. Kaynak Araştırması.....	47
3.2. Model ve Çözüm Yöntemi .....	49

4. MATERYAL ve YÖNTEM .....	55
4.1. Materyal .....	55
4.1.1. Bovin serum albümin (BSA).....	55
4.1.2. Serin alkali proteaz (SAP).....	55
4.1.3. PES ve CTA membranlar.....	56
4.2 Deneysel Yöntem.....	57
4.2.1. Protein-membran etkileşimleri: Statik adsorpsiyon deneyleri.....	57
4.2.2. Membran zeta potansiyellerinin belirlenmesi .....	58
4.2.3. Etkin difüzyon katsayısı bulunması .....	59
4.3. Analitik Yöntemler .....	61
4.3.1. Protein analizi .....	61
4.3.2. FTIR-ATR ölçümleri .....	62
4.3.3. SEM ve AFM analizleri .....	62
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	63
5.1. BSA'nın 10 kDa PES Membranlara Adsorpsiyonu.....	63
5.2. BSA'nın 10 kDa CTA Membranlara Adsorpsiyonu.....	64
5.3. BSA'nın 100 kDa PES Membranlara Adsorpsiyonu.....	77
5.4. Membranların Yapısında BSA Adsorpsiyonu Sonucu	
Meydana Gelen Değişimler .....	85
5.4.1. PES membranların FTIR-ATR analizleri .....	85
5.4.2. CTA membranların FTIR-ATR analizleri .....	92
5.4.3. PES membranların SEM analizleri .....	100
5.4.4. CTA membranların SEM analizleri .....	102
5.4.5. PES membranların AFM analizleri.....	103
5.5. Elektrokinetik Ölçümler/ Hesaplamalar.....	105
5.5.1. PES membranların yüzey yükleri/zeta potansiyelleri .....	106
5.5.2. CTA membranların yüzey yükleri/zeta potansiyelleri .....	109
5.5.3. Proteinlerin zeta potansiyelleri : BSA.....	111
5.5.4. DLVO teorisi ile ara yüzey etkileşim enerjilerinin hesaplanması .....	111

5.6. SAP'ın 100kDa PES Membranlara Adsorpsiyonu .....	123
5.6.1. pH etkisi .....	117
5.6.2. İyonik çevre etkisi .....	117
5.7. PES Membranların Yapısında SAP Adsorpsiyonu Sonucu	
Meydana Gelen rDeğişimler .....	123
5.8. SAP Üretim Ortamındaki Bileşenlerin PES Membran	
Zeta Potansiyeline Etkisi.....	127
5.9. BSA ve SAP'ın 100 kDa PES Membranlarda Etkin Difüzyon Katsayıları .....	130
5.9.1. BSA etkin difüzyon katsayısının iyonik çevre ile değişimi .....	130
5.9.2. SAP etkin difüzyon katsayısının iyonik çevre ile değişimi .....	135
<b>6. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>138</b>
6.1. BSA'nın PES (10 kDa ve 100 kDa) ve CTA (10 kDa)	
Membranlara Adsorpsiyonu.....	138
6.2. BSA Adsorpsiyonu Sonucunda Membran Yapısında	
Meydana Gelen Değişimler.....	142
6.3. Protein (BSA)-Membran Etkileşim Enerjileri .....	143
6.4. SAP'ın 100 kDa PES Membranlara Adsorpsiyon Sonuçları .....	145
6.5. İyonik Çevrenin 100 kDa PES Membranların	
Zeta Potansiyelleri Üzerine Etkisi.....	148
6.6. SAP Adsorpsiyonu Sonucunda Membran Yapısında Meydana	
Gelen Değişimler .....	149
6.7. BSA ve SAP'ın 100 kDa PES Membranda Etkin Difüzyon Katsayıları .....	149
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>151</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>154</b>
EK 1 .....	155
EK 2 .....	162
EK 3 .....	163
EK 4 .....	165
EK 5 .....	167
EK 6 .....	163

EK 7 .....	169
EK 8 .....	174
ÖZGEÇMİŞ .....	177

## SİMGELER DİZİNİ

A	Hamaker sabiti
C	Membran gözeneklerindeki çözelti protein derişimi
C*	Sıvı faz protein denge derişimi
C <sub>i</sub>	İyon derişimi
C <sub>ib</sub>	Besleme derişimi
C <sub>is</sub>	Membran yüzeyindeki <i>i</i> partikülünün doygunluk derişimi
C <sub>o</sub>	Başlangıç protein derişimi
Co	Yığın elektrolit derişimi
D <sub>e</sub>	Etkin difüzyon katsayısı
E	Akım potansiyeli
<i>e</i>	Elektronik yük
E <sub>e</sub>	Elektrostatik etkileşim enerjisi
E <sub>w</sub>	van der Waals etkileşim enerjisi
F	Faraday sabiti
<i>h</i>	Membran kalınlığı
H	Protein ve membran arasındaki ayırma mesafesi
I	İyonik gerilim
J	Filtrat akısı
K	Adsorpsiyon denge sabiti
k	Kütle aktarım katsayısı
M <sub>A</sub>	Molekül ağırlığı
N	Karıştırma hızı
N <sub>y</sub>	Moleküler aktarım akısı
pKa	Amino asitlerin ayrışma sabiti
q	Membran yüzeyine/gözeneklerine adsorplanan madde miktarı
R	İdeal gaz sabiti
R <sub>c</sub>	Kek tabakası direnci
R <sub>m</sub>	Membranın hidrolük direnci

$r_s$	Proteinin yarıçapı
$r_p$	Gözenek yarıçapı
$R_t$	Toplam direnç
$T$	Mutlak sıcaklık
$Z$	Proteinin net yükü
$z_i$	İyon değeri
$\Delta P_{TMP}$	Membran geçiş basıncı
$\Delta P$	Basınç farkı
$\varepsilon$	Membran gözenekliliği
$\Lambda$	Ortamın iletkenliği
$\eta$	Viskozite
$\zeta$	Zeta potansiyeli
$\kappa^{-1}$	Çift tabaka kalınlığı
$\varepsilon_0$	Ortam geçirgenliği
$\sigma_p$	Yüzey yük yoğunluğu
$\varepsilon_r$	Ortam dielektrik sabiti

### Kısaltmalar

AFM	Atomik kuvvet mikroskop
BSA	Bovin serum albumin
CTA	Selüloz triasetat
FTIR-ATR	Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometresi-azaltılmış toplam yansıma
MF	Mikrofiltrasyon
MWCO	Molekül ağırlığı tutma değeri
NF	Nanofiltrasyon
PES	Polietersülfon
SAP	Serin alkali proteaz
SEM	Taramalı elektron mikroskop

TMP	Membran geçiş basıncı
TO	Ters ozmoz
UF	Ultrafiltrasyon

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Akış yönlerine göre filtrasyon işlemleri .....	8
Şekil 2.2. Membran morfolojisinin şematik gösterimi .....	12
Şekil 2.3. Gözenek yapılarına göre membranlar .....	13
Şekil 2.4. PES membran kimyasal yapısı .....	16
Şekil 2.5. CTA membran kimyasal yapısı .....	18
Şekil 2.6. Proteinlerdeki polipeptid zincirinin yapısı.....	19
Şekil 2.7. Proteinlerin pH'a bağlı olarak farklı iyonlaşma durumları .....	20
Şekil 2.8. İnsülin hormonunun birincil yapısı.....	21
Şekil 2.9. Ribonükleaz-A enziminin ikincil yapısı .....	22
Şekil 2.10. Ribonükleaz A enziminin üçüncül yapısı .....	23
Şekil 2.11. Proteinler tersiyer yapılarının kararlılığında rol oynayan etkileşimler.....	24
Şekil 2.12. Proteinlerin yapı seviyeleri .....	24
Şekil 2.13. Pozitif yüklü bir yüzey ile yığın arasındaki iyon dağılımının şematik gösterimi ve zeta potansiyelinin tanımı .....	29
Şekil 2.14. BSA agregasyonunun şematik gösterimi.....	38
Şekil 3.1. Membran içinde seçilen hacim elemanının gösterimi .....	49
Şekil 3.2. Difüzyon hücresi içindeki derişim profili.....	52
Şekil 4.1. Akım potansiyeli ölçümü deney sistemi.....	59
Şekil 4.2. Etkin difüzyon katsayısının bulunması için deney sistemi.....	60
Şekil 5.1. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	65
Şekil 5.2. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	66
Şekil 5.3. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=3.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	67

Şekil 5.4. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	68
Şekil 5.5. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	69
Şekil 5.6. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın 10 kDa PES membranlara adsorpsiyon denge izotermi .....	70
Şekil 5.7. Co=2.47 g/L, pH= 6.80 ve 0.01M KCl koşullarında BSA'nın cama adsorpsiyonu kontrol deneyi .....	71
Şekil 5.8. BSA'nın 10 kDa CTA membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	72
Şekil 5.9. BSA'nın 10 kDa CTA membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	73
Şekil 5.10. BSA'nın 10 kDa CTA membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	74
Şekil 5.11. BSA'nın 10 kDa CTA membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	75
Şekil 5.12. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın 10 kDa CTA membranlara adsorpsiyon denge izotermi .....	76
Şekil 5.13. Co=1 g/L, pH= 6.80 ve 0.01 M KCl koşullarında BSA'nın 10 kDa CTA membranlara adsorpsiyonunda karıştırma hızı etkisi .....	77
Şekil 5.14. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	78
Şekil 5.15. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	79

Şekil 5.16. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=3.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	80
Şekil 5.17. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	81
Şekil 5.18. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	82
Şekil 5.19. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=3.78 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi .....	83
Şekil 5.20. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın 100 kDa PES membranlara adsorpsiyon denge izotermi .....	84
Şekil 5.21. pH=6.80, I=0.01 M koşullarında Co=1 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 10 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu.....	86
Şekil 5.22. Polipeptid zinciri üzerinde adsorpsiyon yapan gruplar .....	87
Şekil 5.23. pH=3.78 , I=0.01 M koşullarında Co=1 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 10 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu .....	88
Şekil 5.24. pH=4.78 , I=0.01 M koşullarında Co=1 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 10 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu .....	88
Şekil 5.25. Co=1g/L BSA derişimi ve pH=6.80 koşullarında 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim koşullarında kirlenmiş membranların karşılaştırmalı spektrumu.....	91
Şekil 5.26. Co=1g/L BSA derişimi ve pH=4.78 koşullarında 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim koşullarında kirlenmiş membranların karşılaştırmalı spektrumu.....	91
Şekil 5.27. pH=3.78, I=0.01 M koşullarında Co=2.5 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 100 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu .....	93
Şekil 5.28. pH=4.78, I=0.01M koşullarında Co=2.5 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 100 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu .....	94

Şekil 5.29. pH=6.80, I=0.01M koşullarında Co=2.5 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 100 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu .....	94
Şekil 5.30. Co=2.5 g/L BSA derişimi ve pH=6.80 koşullarında 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim koşullarında kirlenmiş 100 kDa PES membranların karşılaştırmalı spektrumu .....	96
Şekil 5.31. Co=2.5 g/L BSA derişimi ve pH=3.78 koşullarında 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim koşullarında kirlenmiş 100 kDa PES membranların karşılaştırmalı spektrumu .....	97
Şekil 5.32. pH=4.78, I= 0.01 M ve Co=1 g/L BSA koşullarında kirlenmiş ve temiz 10 kDa CTA membranın FTIR-ATR spektrumu .....	98
Şekil 5.33. pH=6.80, I=0.01M ve Co=1g/L BSA ve kirlenmiş 10 kDa CTA ve temiz membranın FTIR-ATR spektrumu.....	99
Şekil 5.34. 10 kDa PES membranın Co=1g/L BSA ve pH=3.78 koşullarında kirlenmiş SEM fotoğrafı .....	100
Şekil 5.35. 100 kDa PES membran SEM fotoğrafları; temiz (a) 0.01M KCl, Co=2g/L BSA ile kirlenmiş; (b) pH=4.78, (c) pH=3.78.....	101
Şekil 5.36. 10 kDa CTA membran SEM fotoğrafları; (a) temiz, (b) pH=6.80, 0.01M KCl, Co=2g/L BSA ile kirlenmiş .....	102
Şekil 5.37. 10 kDa temiz PES membran AFM görüntüsü .....	103
Şekil 5.38. pH=3.78, I=0.01 M ve Co=1.5 g/L BSA ile kirlenmiş 10 kDa PES membranın AFM görüntüsü .....	104
Şekil 5.39. pH=4.78, I=0.01 M, Co=1.5 g/L BSA ile kirlenmiş 10 kDa PES membranın AFM görüntüsü .....	104
Şekil 5.40. pH=6.80, I=0.01 M ve Co=1.5 g/L BSA ile kirlenmiş 10 kDa PES membranın AFM görüntüsü .....	105
Şekil 5.41. 10 kDa PES membranın 0.01M ve 0.1 M iyonik gerilim ve üç farklı pH değerlerinde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi.....	107
Şekil 5.42. 100 kDa PES membranın 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim ve üç farklı pH değerlerinde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi....	108
Şekil 5.43. 10 kDa CTA membranın 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim ve iki farklı pH değerlerinde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi ...	110

Şekil 5.44. SAP'ın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=7.14 ve 0.04 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi.....	116
Şekil 5.45. SAP'ın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=9.08 ve 0.04 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi.....	116
Şekil 5.46. SAP'ın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=11.06 ve 0.04 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi.....	116
Şekil 5.47. SAP'ın 100 kDa PES membranlara farklı pH değerlerinde adsorpsiyon izotermi.....	117
Şekil 5.48. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve 0.04 M fosfat tamponu + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ortamında 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzimderişiminin zamanla değişimi .....	118
Şekil 5.49. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve 0.04 M fosfat tamponu + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ortamında 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi .....	119
Şekil 5.50. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve 0.04 M fosfat tamponu + CaCl <sub>2</sub> ortamında 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi .....	119
Şekil 5.51. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve 0.04 M fosfat tamponu + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + CaCl <sub>2</sub> ortamında 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi.....	120
Şekil 5.52. SAP'ın 100 kDa PES membranlara üretim ortamındaki bileşenlerin varlığında adsorpsiyon izotermi.....	120
Şekil 5.53. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve fermentasyon ile üretilen SAP'ın 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi.....	122

Şekil 5.54. Fermentasyon ile üretilen SAP enziminin 100 kDa PES membranlara adsorpsiyon izotermi .....	122
Şekil 5.55. Co=1 g/L SAP derişiminde ve pH=7.14 koşullarında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu .....	123
Şekil 5.56. Co=1 g/L SAP derişiminde ve pH=9.08 koşullarında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu .....	124
Şekil 5.57. Co=1 g/L SAP derişiminde ve pH=11.06 koşullarında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu .....	124
Şekil 5.58. Co=1 g/L SAP derişiminde, pH=7.14 ve (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ortamında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu .....	125
Şekil 5.59. Co=1 g/L SAP derişiminde, pH=7.14 ve KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ortamında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu .....	126
Şekil 5.60 Co= 1 g/L SAP derişiminde, pH=7.14 ve CaCl <sub>2</sub> ortamında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu .....	126
Şekil 5.61. Co=1 g/L SAP derişiminde, pH=7.14 ve (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + CaCl <sub>2</sub> ortamında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu .....	127
Şekil 5.62. 100 kDa temiz PES membranın farklı iyonik çevrelerde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi .....	128
Şekil 5.63. 100 kDa kirli PES membranın farklı iyonik çevrelerde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi .....	129
Şekil 5.64. 100 kDa temiz PES membranın SEM fotoğrafı.....	131
Şekil 5.65. Co=0.5 g/L BSA, pH=4.78, I=0.01 M koşullarında 100 kDa PES membranda BSA difüzyonu sırasında sıvı faz derişiminin zamanla değişimi kontrol deney sonuçları .....	132
Şekil 5.66. Co=0.5 g/L BSA, pH=4.78, I=0.01 M koşullarında 100 kDa PES membranda BSA difüzyonu sırasında sıvı faz derişiminin zamanla değişimi: Deney ve model verileri .....	133

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ultrafiltrasyonun spesifik uygulamaları .....	7
Çizelge 2.2. Membran proseslerinin özellikleri .....	11
Çizelge 2.3. Fermentasyon ortamındaki bazı bileşenler ve partikül boyutları.....	14
Çizelge 2.4. Sentetik membran üretim yöntemleri .....	15
Çizelge 2.5. Bazı membranlar ve uygulamaları .....	18
Çizelge 2.6. R-gruplarına göre amino asitlerin sınıflandırılması.....	20
Çizelge 2.7. Zeta potansiyeli belirleme yöntemlerinin sınıflandırılması .....	30
Çizelge 2.8. Bir proteinde iyonlaşabilen amino asitler ve ayrışma sabitleri.....	33
Çizelge 4.1. BSA'nın amino asit bileşimi.....	55
Çizelge 4.2. SAP'ın amino asit bileşimi .....	56
Çizelge 4.3. SAP'ın r-Bacillus licheniformis'den üretimi için fermentasyon ortam bileşimi .....	56
Çizelge 4.4. Membranların özellikleri .....	57
Çizelge 5.1. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın PES membranlara adsorpsiyon izoterm denklemleri .....	70
Çizelge 5.2. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın CTA membranlara adsorpsiyon izoterm denklemleri .....	76
Çizelge 5.3. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın 100 kDa PES membranlara adsorpsiyon denge izotermi .....	84
Çizelge 5.4. Temiz ve BSA ile kirlenmiş PES ve CTA membranların muhtemel kromofor grupları.....	87
Çizelge 5.5. 10 ve 100 kDa PES membranların zeta potansiyellerinin iyonik çevre ile 109değişimi .....	109
Çizelge 5.6. 10 kDa CTA membranların zeta potansiyellerinin iyonik çevre ile değişimi.....	110
Çizelge 5.7. BSA'nın net yükü ve zeta potansiyelinin pH ve iyonik gerilim ile değişimi.....	112
Çizelge 5.8. BSA ve 10 kDa PES membran arasında elektrostatik, van der Waals ve toplam etkileşim enerjileri.....	113

Çizelge 5.9. BSA ve 10 kDa CTA membran arasında elektrostatik, van der Waals ve toplam etkileşim enerjileri.....	113
Çizelge 5.10. BSA ve 100 kDa PES membran arasında elektrostatik, van der Waals ve toplam etkileşim enerjileri.....	113
Çizelge 5.11. SAP'ın farklı pH değerlerinde 100 kDa PES membranlara adsorpsiyon denge izoterm denklemleri.....	117
Çizelge 5.12. SAP üretim ortamı bileşenlerinin enzimin 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonunda elde edilen denge izoterm denklemleri.....	121
Çizelge 5.13. İyonik çevrenin 100 kDa PES membranların elektrokinetik özellikleri üzerine etkileri .....	128
Çizelge 5.14. Membran kalınlığının (h), etkin difüzyon katsayısına etkisi .....	130
Çizelge 5.15. Membran gözenekliliğinin BSA etkin difüzyon katsayısına etkisi.....	131
Çizelge 5.16. pH=4.78, 0.01 M KCl ve Co=0.5 g/L başlangıç derişiminde BSA'nın 100 kDa PES membrandan difüzyonu: Deney ve model verileri.....	134
Çizelge 5.17. Farklı iyonik çevrelerde Co=0.5 g/L derişiminde BSA'nın 100 kDa PES membranlarda etkin difüzyon katsayıları .....	134
Çizelge 5.18. Co=0.5 g/L, pH=7.14, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ortamında SAP'ın 100 kDa PES membrandan difüzyonu: Deney ve model verileri .....	137
Çizelge 5.19. SAP'ın fermentasyon ortamını bileşenlerinin varlığında Co=0.5 g/L derişiminde, pH=7.14'de 100 kDa PES membranlarda etkin difüzyon katsayıları.....	137

## 1. GİRİŞ

Yaklaşık 40 yıl önce üretilen ilk sentetik membranların endüstriyel uygulamalarına geçilmesi ile, membran ayırma işlemlerinden teknik ve ticari açılardan beklentiler fazla ve birçok potansiyel uygulamaları nedeniyle de beklenen pazar payı milyarlarca dolardı. Ancak tüm beklentilere karşın, membran teknolojisinin gelişiminde bir gecikme olmuştur. Hemodiyaliz, deniz suyu tuzunun giderilmesi için ters ozmoz, yüzey suyunun mikro ve ultrafiltrasyonu, gıda ve farmasötik ürünlerin ayrılması, deriştirilmesi, saflaştırılması ve yakıt hücreleri gibi bazı uygulamaları günümüzde henüz önem kazanmıştır. Son zamanlarda taşınım özellikleri iyileştirilmiş, ısıl ve kimyasal kararlılığı artırılmış membranların geliştirilmesiyle membran proseslerinin yeni potansiyel uygulamaları ortaya çıkmış ve bu uygulamaların endüstriyel ölçeğe geçirilmesi ile de membran endüstrisi beklenen yüksek satış payına ulaşmıştır. 1998 yılında dünyada membran satış payları, membran ve modüller için  $4 \times 10^9$  \$, membran sistemleri için  $15 \times 10^9$  \$ ve yılda satış hacmindeki büyüme %8-10' değerindedir (Strathmann 2001).

Membranlarla sağlanan ayırma ve deriştirme yöntemlerinin sahip olduğu üstünlüklerden dolayı biyoteknolojik uygulamalarında önemli artışlar kaydedilmiştir. Mikrofiltrasyon (MF), ultrafiltrasyon (UF), ters ozmoz (TO) ve nanofiltrasyon (NF) gibi basınç etkili membran ayırma işlemlerinin endüstriyel uygulamaları fazla olmasına rağmen, son yıllarda ürün geri kazanımında çeşitli avantajlar sunan sıvı membranlar ve pervaporasyon gibi geliştirilen yeni membran proseslerinin de endüstriyel uygulamalarında artışlar kaydedilmiştir. Ayrıca membran biyoreaktörlerin membran ayırma işlemleri ile birlikte kullanılmasıyla biyomühendislik alanında yeni ufuklar/uygulamalar açılmıştır (Howell 1993).

Biyoteknolojik prosesler ve biyoürünler içinde oldukça önemli yeri olan proteinler, hücrede metal iyonlarının, oksijenin ve metabolitlerin taşınımını sağlamaları, bazı hücrel faaliyetleri düzenlemeleri, bağışıklık sistemi proteinlerinin enfeksiyonlara karşı

organizmayı korumaları gibi çeşitli işlemlere sahip biyolojik moleküllerdir (Smith ve Hill 1983). Proteinlerin, özellikle katalitik özelliğe sahip enzimlerin ayırma işlemleri sırasında yüksek saflıkta geri kazanımları, yapılarının denatüre olmaması ve enzimlerin katalitik aktivitelerini kaybetmemeleri kullanılacakları bir sonraki proses için önemlidir.

Biyoteknolojik proseslerde hücreler tarafından üretilen ürünler, hücre içinde (intracellular) bulunabildiği gibi hücre dışına da (extracellular) salgılanabilir. Her iki durumda da biyoürünlerin izolasyonu ve saflaştırılması gerekir. Biyoürünler işlem koşullarından etkilenebilen duyarlı yapıya sahip oldukları için, ayırma işlemi seçimine ve uygulama tekniğine dikkat edilmeli, öncelikle prosesin uygulanacağı ortamın gerekleri ortaya konulmalıdır. Biyoürün karışımının -ayırma işlemlerinin seçiminde göz önüne alınması gereken- bazı spesifik özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

- Biyoürünler seyreltik çözeltilerden geri kazanılmak zorundadır. Alkol, sitrik asit ve asetik asit fermentasyonlarında derişim yüksek olmakla beraber; enzim, antibiyotik ve vitamin gibi yüksek değerli ürünlerin üretiminde derişim düşüktür. Bu ürünlerin geri kazanımı ve saflaştırması oldukça pahalıdır.
- Biyoürünlerin çok çeşitli olması ve ürünlerin kimyasal yapı ve boyutunun birbirinden farklı olması ayırma işleminin önemli bir sorunudur.
- Biyoürünler sıcaklık, pH, çözücü ve kesme gerilimine karşı oldukça hassastırlar. Bunun anlamı, örneğin, kimya endüstrisinde çok sık kullanılan distilasyon ile ayırma işleminin bir biyoayırma işleminde uygulanamayacağıdır.
- Biyoürünler yüksek değerlikli ürünler oldukları için, ayırma tekniği ürün kaybının olmamasını sağlamalıdır.

Fermentasyon prosesinden sonra ortamdan biyoürünleri ayırma ve saflaştırma işlemleri toplam maliyet içinde yaklaşık %50'lik paya sahiptir. Biyodönüşüm verimliliği arttıkça ayırma ve saflaştırma işlemlerinin genel maliyet içindeki payları daha da yükselecektir. Bu nedenle ayırma-saflaştırma işlemlerinin biyoteknolojik üretimler için özel olarak geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Biyoproses sonunda reaktördeki sıvı ortamın özellikleri kimyasal proseslerdekinden farklıdır. Biyoproses tamamlandıktan sonra bile reaktördeki dönüşüm devam edebileceğinden sıvının karakteri sürekli değişir ve bu nedenle biyoürünün ortamdaki ayrılmasından uzun süre depolanabilmesi mümkün değildir. Ayrıca, üretim sonunda reaktördeki oksijen ve besin miktarı sürekli olarak azalacağından mikroorganizmaların morfolojik değişimleri nedeniyle biyoürünü tüketmeleri de söz konusu olabilir. Bütün bu nedenler, üretim durdurulur durdurulmaz ayırma işlemlerine başlanmasını zorunlu kılmaktadır.

Ultrafiltrasyon, mikrofiltrasyon gibi ayırma işleminde membran yüzeyinde ve/veya gözeneklerinde biriken biyomoleküller membran ile (protein-membran) ve kendi aralarında (protein-protein) fizikokimyasal, elektrostatik ve sterik etkileşimlere uğrarlar. Kirlilik olarak adlandırılan adsorpsiyon (protein-membran etkileşimleri) ve agregasyon (protein-protein etkileşimleri), filtrat akısının azalmasına, dolayısıyla ayırma performansının düşmesine neden olmaktadır. Membran kirlilik mekanizmasının aydınlatılması ve ayrıca proteinin yapısal özelliklerindeki değişimlerin belirlenmesi için bu etkileşimlerin bilinmesi önemlidir. Amfoter özellik taşıyan ve sulu çözeltilerinde kolloidal davranış gösteren proteinlerin çözelti pH değerlerinin ayarlanması ve iyonik gerilim yaratılması ile elektrostatik kuvvetler, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşim kuvvetleri gibi ara yüzey kuvvetlerinin sebep olduğu bu etkileşimlerin kontrol edilmesi mümkündür. Bu şekilde elde edilecek veriler, protein ayrılmasında kullanılacak membranın yüzey özellikleri ve yüzey yükü/zeta potansiyeli ile ilgili modifikasyonun biyomolekülün yapısında ve işlevinde en az değişime neden olabilecek şekilde yapılmasını sağlayarak daha spesifik ayırmanın hatta saflaştırma basamağına kadar ulaşabilen ayırmanın yapılmasını mümkün kılacaktır.

Ultrafiltrasyon moleküler seviyede ayırma sağlayan modern bir membranla ayırma tekniğidir ve son yıllarda bu yöntem ile enzim ve diğer proteinlerin ayrılması ve saflaştırılması çalışmaları giderek artmaktadır. Ultrafiltrasyonun, klasik ayırma yöntemlerine göre düşük basınç ve sıcaklıkta gerçekleşmesi, faz değişiminin olmaması,

kimyasal madde tüketiminin az olması ve steril koşulların sağlanabilmesi gibi üstünlükleri vardır (Fane ve Radovich 1990, Mulder 1992). Ultrafiltrasyon ve membranla sağlanan diğer ayırma teknikleri bu üstünlükleri ve işlem sırasında aktivite kaybının az olmasından dolayı biyokimyasal ürün endüstrisinde *ileri teknolojik ayırma işlemleri* olarak isimlendirilmektedir. Ürünün kalitesi, kimyasal yapı ve aktivite en az seviyede değiştiği zaman artmaktadır. Ultrafiltrasyon, sahip olduğu nitelikler sayesinde yüksek kalitede ürün elde etmek için iyi bir ayırma işlemidir.

Ultrafiltrasyon işleminde meydana gelen kirlilik mekanizmasının tamamen aydınlatılamaması ve mekanizma için mevcut modellerin geçerliliğinin tartışılması, protein ve enzimlerin ultrafiltrasyon membranlarda ayırılmaları esnasında meydana gelen etkileşimlerin farklı boyutlardan incelenmesi gereğini doğurmaktadır. Bu doktora çalışmasının kapsamı oluşturulurken, ultrafiltrasyon ayırma performansı üzerine önemli etkilere sahip olan adsorpsiyon sonucu membran yüzeyi ile membran gözeneklerinde meydana gelen kirliliğin mekanizmalarıyla birlikte ortaya konularak aydınlatılması ve çapraz akım ultrafiltrasyon sistemi için ara yüzey etkileşimleri ile gözenekli ortamdaki akış teorilerinin uygulanmasını içeren yeni bir modelinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaların ilerlemesi ile birlikte protein-membran ara yüzey etkileşimlerinin önemi ön plana çıkmış ve farklı iyonik çevre koşulları ile değişen bu koloidal etkileşimlerin de örtüştüğü -membran işletim türünden ve hidrodinamik koşullarından bağımsız olarak tanımlanan- etkin difüzyon katsayısının bulunmasına yönelik yeni bir model ve deney sistemi tasarımı yapılmıştır. Bu şekilde, çapraz akım ultrafiltrasyon sisteminin modellenmesi yerine, o modelde de kullanılabilecek önemli bir tasarım parametresi belirlenmiştir.

Bu çalışmada, başlıca farklı kimyasal yapıda ultrafiltrasyon membranlar ile farklı özelliklere sahip proteinler arasındaki protein-membran etkileşimlerine iyonik çevrenin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla model protein olarak ele alınan bovin serum albümin (BSA) ile elde edilen bulgular, literatürde üzerine en çok araştırma yapılan protein olduğu için sonuçları karşılaştırma, doğrulama veya red etme imkanını vermiştir. Model

enzim olarak seçilen ve önemli bir endüstriyel enzim olan serin alkali proteaz (SAP) üzerine ise membran ve enzim arasındaki etkileşimleri inceleyen bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Protein ve enzim gibi birim fiyatı yüksek biyoteknolojik ürünlerin üretim ortamından ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılan ultrafiltrasyon işlemlerinde en önemli darboğazı oluşturan membran kirliliğini en aza indirecek şartların belirlenmesi ürün maliyetinin aşağı çekilmesi açısından önemlidir.

Bu doktora çalışması, proteinlerin yarattığı membran kirliliğinin sistematik ve kapsamlı bir şekilde moleküler düzeyde incelenmesi amacıyla 5 alt projeye bölünerek yürütülmüştür:

### ***1. Alt Proje: Membran Özelliklerinin Kirliliğe Etkisi***

- Farklı kimyasal yapıda hidrofob (polietersülfon, PES) ve hidrofil (selüloz triasetat, CTA) membranlar kullanılarak protein (BSA)-membran etkileşiminde membran yapısının etkisinin incelenmesi
- Farklı molekül ağırlığı tutma değerindeki (MWCO) PES membranlar kullanılarak, membranların BSA ile etkileşiminde gözenek boyutunun ve adsorpsiyon konumunun etkisinin incelenmesi

### ***2. Alt Proje: Çözelti Özelliklerinin Kirliliğe Etkisi***

- pH: Model proteinlerin izoelektrik noktasında, izoelektrik noktasının altında ve üzerinde çalışılarak, pH ile konformasyonu ve yüzey yükü/zeta potansiyeli değişen biyomoleküller ile yine pH'a bağlı olarak yüzey yükü/zeta potansiyeli değişen membranın etkileşimlerinin incelenmesi
- İyonik gerilim: Protein ve membranın elektrokinetik özelliklerinin iyonik gerilim ile değişimlerinin belirlenmesi
- İyon türü: SAP fermentasyon ortamında bulunan tampon ve tuzların dolayısıyla farklı değerlikli anyon ve katyonların membran yüküne ve aynı zamanda proteinin

çözünürlüğüne etkilerinin incelenerek, protein-membran ara yüzey etkileşimlerine etkilerinin incelenmesi

### ***3. Alt Proje: Membran Yüzeyindeki Değişimlerin Belirlenmesi***

- Farklı iyonik koşullarda membranlarda oluşan kirliliğin membran yüzey yapısında meydana getirdiği değişimlerin spektroskopik (FTIR-ATR) ve mikroskopik (SEM ve AFM) tekniklerle belirlenmesi

### ***4. Alt Proje: Ara Yüzey Etkileşim Enerjilerinin Hesaplanması***

- Membran ve proteinin farklı iyonik çevre koşullarında elektrokinetik özelliklerinin belirlenerek DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overback) teorisine göre ara yüzey etkileşim enerjilerinin hesaplanması

### ***5. Alt Proje: Membranda Etkin Difüzyon Katsayısının Belirlenmesi***

- Membranda kütle korunum temeline dayalı bir model kurulması ve modelin difüzyon hücresi temeline dayalı bir sistemde farklı iyonik çevrelerde alınan deney verilerinden yararlanarak çözülmesi ile membran kirliliğinin kantitatif bir ölçütü ve önemli bir tasarım parametresi olan etkin difüzyon katsayısının belirlenmesi

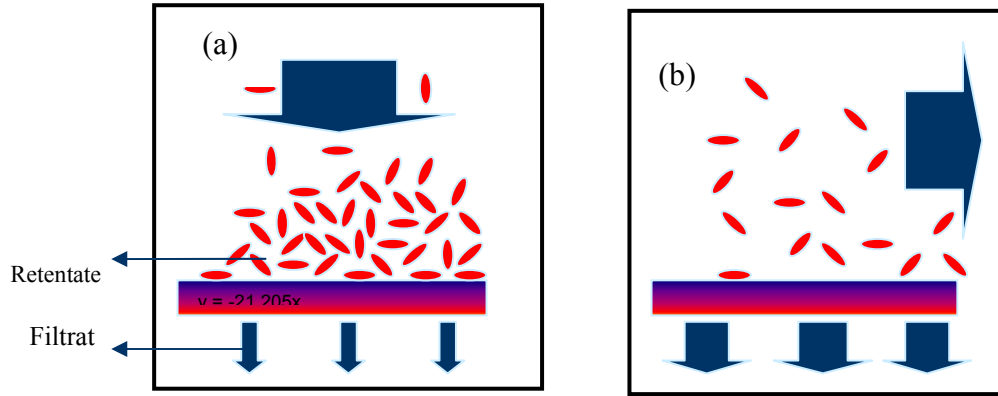
## 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Membran Prosesleri

Moleküler seviyede ayırma sağlayan membran prosesleri dört temel alanda kullanılmaktadır. Bunlar; karışımların moleküler ayrılması, kontrollü ilaç salınımı, membran reaktörler-yapay organlar ve enerji depolanması-dönüşüm sistemleridir (Strathmann 2001). Biyoteknolojik uygulamalarından başka bu yöntemlerin en çok kullanıldığı alanlar, polimer reçinelerin ve pigmentlerin geri kazanımı için boya endüstrisi, yıkama suyundaki tutkallı maddelerin tutulması için tekstil endüstrisi, deniz suyunun saflaştırılması ve kağıt endüstrisidir (Mark ve Othmer 1983). Çizelge 2.1’de ayırma proseslerine örnek olarak ultrafiltrasyonun endüstriyel uygulamaları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Ultrafiltrasyonun spesifik uygulamaları (Atkinson ve Mavituna 1991)

Proses	UF uygulaması	Problemler	Alternatif/yarıştığı prosesler
Biyolojik makromolekül üretimi	Biyolojik molekülün deriştirilmesi, saflaştırılması	Yüksek gerilimler molekül parçalanmasına sebep olabilir	Diyaliz, iyon değişimi, liyofilizasyon, seçici çöktürme
Süt endüstrisi	Peyniraltı suyundan değerli proteinlerin uzaklaştırılması ve deriştirilmesi	Kirlenme ve sık temizlik	----
Elektronik ve farmasötik	Medikal kullanım için steril akışkan hazırlanması	----	----
Pirojen uzaklaştırma, virus deriştirme	Virus belirlenmesinde su yüzeyinden virusun uzaklaştırılması	Kirlenme	----
Nefroloji	Toksik metabolik atıkların uzaklaştırılması için suni böbrek görevi yapmak	Kompleks sistem olduğu için kontrolü çok iyi yapılmalı	Diyaliz



Şekil 2.1. Akış yönlerine göre filtrasyon işlemleri  
a) Klasik filtrasyon b) Çapraz akış filtrasyon

Membranla ayırma işlemlerinin temel prensibi membran yüzeyine taşınan ve farklı büyüklükte bileşikler içeren çözelti bileşenlerinin membrandan geçirilerek ayrılmasıdır. Bu şekilde besleme akımı membrandan geçerek süzülen *filtrat çözeltisi* ve membrandan geçemeyerek kalan *derişik çözelti (retentate)* olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.1).

*Klasik filtrasyonda* besleme çözeltisinin akış yönü membran yüzeyine diktir (Şekil 2.1a). Çözeltinin bu şekilde membrana gönderilmesi sonucunda, bir süre sonra membrandan geçemeyen partiküllerin yüzeyde birikmesi ile oluşan kek tabakası filtrasyon hızının düşmesine neden olur. *Çapraz akış filtrasyonunda* ise çözelti, membran yüzeyine paralel gönderilerek partiküllerin yüzeyde birikimi ve kek tabakası oluşumu en az seviyeye indirilir ve çapraz akışın etkisiyle, membrandan geçemeyen partiküller membran yüzeyinden uzaklaştırılır (Şekil 2.1b).

Membranla ayırma işlemlerinin performansı birim zamanda, birim membran yüzey alanından geçen çözelti hacmini ifade eden filtrat akısı ( $J$ ) ile tanımlanmaktadır. Filtrat akısı, direnç, ozmotik basınç veya geri akış modellerine göre ifade edilmektedir. Direnç modeli membran gözeneklerindeki akış hızını ifade eden Darcy Kanunu temeline

dayanır. Çapraz akış UF için filtrat akısı veya filtrasyon hızı, membran geçiş basıncına ve toplam dirence bağlı olarak Eşitlik 2.1 ile ifade edilir:

$$J = \frac{\Delta P_{TMP}}{R_t} \quad (2.1)$$

Burada,  $J$  filtrat akısı,  $\Delta P_{TMP}$  membran geçiş basıncı,  $R_t$  ise toplam dirençtir.

Çapraz akım UF'da besleme çözeltisi membran yüzeyine paralel gönderilir ve uygulanan membran geçiş basıncı etkisiyle çözelti membrandan geçirilir. Membrandan geçemeyen partiküllerin yüzeyde birikmesi sonucunda membran yüzeyinde partikül derişimi artar, bu olaya derişim polarizasyonu ismi verilir. Partiküllerin membran yüzeyinde birikmesi ile oluşan kek tabakası ikinci bir membran gibi davranır ve akışa karşı ek bir direnç oluşturur. Buna göre Eşitlik 2.2, Eşitlik 2.1'e analog olarak yazılabilir:

$$J = \frac{\Delta P_{TMP}}{(R_m + R_c)} \quad (2.2)$$

Çapraz akış UF'da yürütücü kuvvet membran geçiş basıncıdır ( $\Delta P_{TMP}$ ). Eşitlik 2.2'de  $R_m$  membranın hidrolik direncini,  $R_c$  ise kek tabakası direncini göstermektedir.

Geri akış modeli, film teorisi temeline dayanmaktadır. Bu teoriye göre membran-çözelti arayüzeyine bitişik ince bir film tabakası vardır ve bu tabakada partikül taşınımı gerçekleşmektedir. Herhangi bir  $i$  partikülünün yığın fazdan membran yüzeyine taşınımı konveksiyon ile olmaktadır. Aynı şekilde membrandan geçerek filtre olan  $i$  partikülünün filtrat deposuna taşınım mekanizması da konveksiyonlardır, ancak membrandan geçemeyerek yüzeyde kalan  $i$  partikülü, kek tabakası ile ana çözelti arasındaki partikül derişimi farkından doğan itici güç nedeniyle kek tabakasından yığın çözeltiliye doğru

moleküler difüzyon ile taşınır (Flaschel vd 1988). Yığın fazdan konveksiyonla aktarılan maddenin, filtrat akımı içinde konveksiyonla membrandan uzaklaşan madde ve geri difüzyonla taşınan madde miktarına eşit olduğu göz önüne alınarak herhangi bir *i* partikülü için yatışkın hal kütle korunum denklemi kurulduğunda düzenlemeler yapılarak filtrat akısı Eşitlik 2.3 ile ifade edilir.

$$J = k \ln \frac{C_{is}}{C_{ib}} \quad (2.3)$$

Burada *k*; kütle aktarım katsayısı,  $C_{ib}$ ; besleme derişimi,  $C_{is}$ ; membran yüzeyindeki *i* partikülünün doyunluk derişimidir.

Çizelge 2.2’de membran işlemlerinin yürütücü kuvvette göre sınıflandırılması yer almaktadır. Osmoz, çözücünün yarı geçirgen bir membran yardımı ile seyreltik ortamdan derişik ortama geçmesidir. Yürütücü kuvvet kimyasal potansiyel farkıdır. İdeal bir yarı geçirgen membranda sadece su, filtrat akımına geçmelidir. Genel bir laboratuvar tekniği olan diyaliz aynı zamanda protein gibi makromoleküllerin saflaştırmasında kullanılan temel bir tekniktir. Yürütücü kuvvet diyaliz hücresinin iç ve dış yüzeyi arasındaki derişim farkıdır. Elektrodializ işleminde voltaj veya elektromotor kuvveti yürütücü kuvettir. Daha yaygın olarak kullanılan basınç etkili ayırma proseslerinin -MF, UF, TO ve NF- farkı moleküllerin taşınımını hızlandırmak için hidrolik basınç uygulanmasıdır. Ancak membranın kendi yapısı da hangi molekülün geçip hangisinin kalacağını kontrol etmektedir.

Ultrafiltrasyon geleneksel ayırma yöntemlerinin herhangi bir basamağında yer alabilen, hatta tek başına bu yöntemlerin yerine kullanılabilen bir işlemdir. Kimyasal madde tüketiminin az olması, steril koşullarda çalışılabilmesi, ayarlanabilir bağımsız işletim sıcaklığı ve düşük enerji ihtiyacı gibi işletme masrafları ve ürün kalitesini etkileyebilecek önemli üstünlüklerin olması, enzim ve protein gibi biyomoleküllerin UF ile ayırma işlemini diğer ayırma yöntemlerine seçimli kılmaktadır.

UF ile ayırma işleminde filtrasyon ve mikrofiltrasyon işlemleriyle ayrılamayan molekül ağırlığı >1000 Da olan bileşikler ayrılır; molekül ağırlığı <1000 Da olan bileşikler ise ters osmoz ile ayrılır. UF, filtrasyon ve MF ile aynı taşınım mekanizmasına sahip olmasına rağmen mekanizma ters osmozdan farklıdır. Filtrasyon, MF ve UF işlemlerinde taşınım mekanizması konveksiyonla, TO işleminde ise difüzyon ile olmaktadır. UF işleminde ozmotik basınç terimi ihmal edilir TO'da bu değer 800-1000 N/m<sup>2</sup> değerleri arasındadır.

Çizelge 2.2. Membran proseslerinin özellikleri (Cheryan 1998)

Proses	Yürütücü kuvvet	Membranda kalan	Membrandan geçen
Ozmoz	Kimyasal potansiyel	Partikül, su	Su
Diyaliz	Derişim	Büyük molekül, su	Küçük molekül, su
Mikrofiltrasyon	Basınç	Süspansiyon halindeki partikül, su	Çözülmüş partikül, su
Ultrafiltrasyon	Basınç	Büyük molekül, su	Küçük molekül, su
Nanofiltrasyon	Basınç	Küçük molekül, iki değerlikli tuz, disosiye asit, su	Bir değerlikli iyon, disosiye olmayan asit, su
Ters osmoz	Basınç	Tüm partiküller, su	Su
Elektrodiyaliz	Voltaj/akım	İyonlaşmayan partikül, su	İyonlaşan partikül, su
Pervaporasyon	Basınç	Uçucu olmayan molekül, su	Uçucu küçük molekül, su

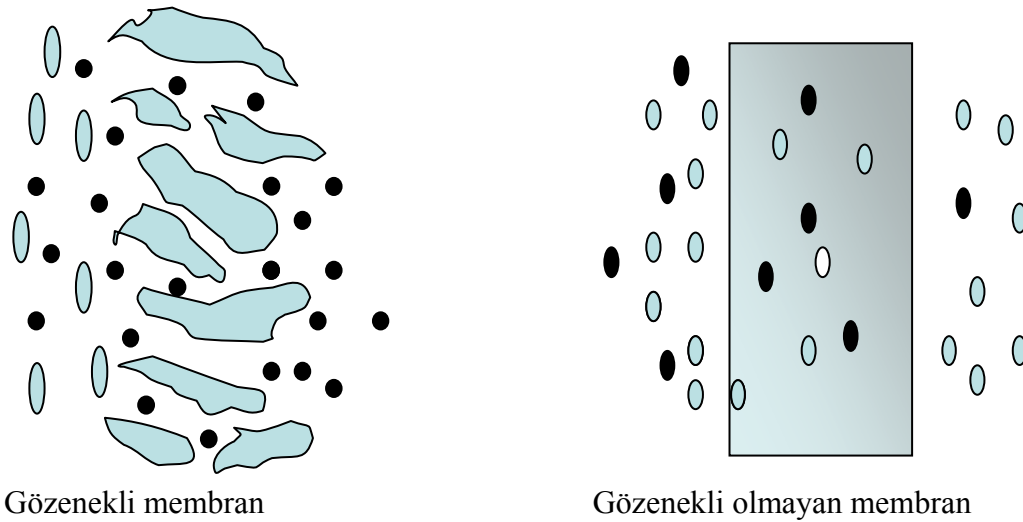
## 2.2. Membranlar

İlk ticari membranlar, 1920'lerin sonlarında bakteriyoloji laboratuvarlarında kullanılmak üzere geliştirilen simetrik yapıda mikrofiltrasyon membranlardır. Endüstriyel membran uygulamalardaki artış, 1962 yılında Loeb ve Sourirajan tarafından

asimetrik membranların üretimiyle başlamıştır. Farklı uygulama alanlarına sahip olan membranlar için genel bir tanım yapılması güçtür. Bu nedenle yapılan en basit tanımlama, membranın bir veya daha fazla bileşenin fazlar içindeki hareketini kısıtlayan ince bir engel olduğu şeklindedir (Howell vd 1993). Membranlar gözenekliliğine göre ikiye ayrılırlar (Şekil 2.2):

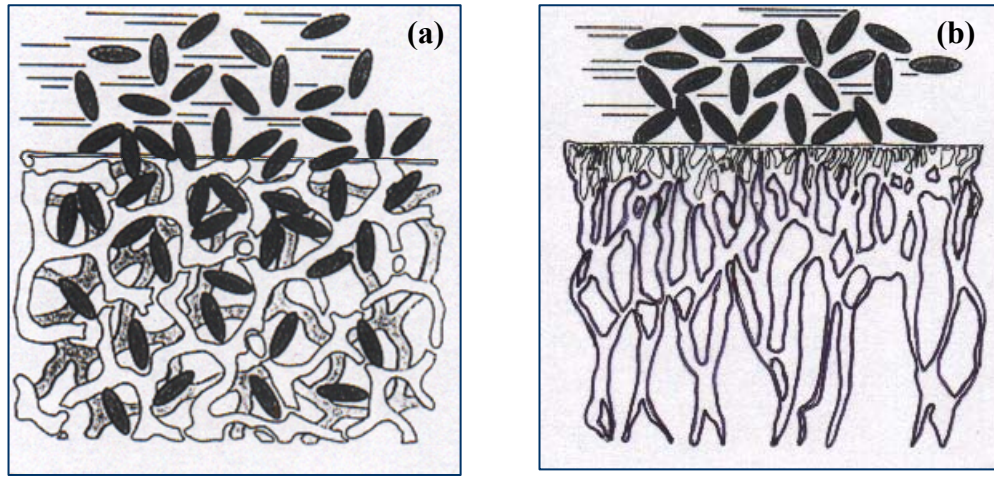
- gözenekli membran
- gözenekli olmayan membran

Gözenekler IUPAC'ın (1985) tanımlamasına göre; makrogözenek (gözenek boyutu  $> 50$  nm), mezogözenek ( $2\text{nm} < \text{gözenek boyutu} < 50$  nm), mikrogözenek (gözenek boyutu  $< 2$  nm) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre MF membranlar makrogözenekler ( $0.05\text{-}5$   $\mu\text{m}$ ), UF membranlar mezogözenekler ( $2\text{-}50$  nm), nanofiltrasyon ve ters ozmoz membranlar ise mikrogözenekler ( $< 2$  nm) içerirler.



Şekil 2.2. Membran morfolojisinin şematik gösterimi

Membranlar gözenek yapılarına göre de simetrik (izotropik/mikrogözenekli) ve asimetrik (anizotropik/ultrafiltrasyon) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Şekil 2.3’de simetrik ve asimetrik membranların gözenek yapıları görülmektedir. Partiküllerin ayrılmasında membranın yüzeyindeki ince tabaka seçici bir engel gibi davranır. Asimetrik membranlarda bu seçici engel üst kısımda ince bir tabaka olmasına karşın, simetrik membranlarda membranın tümü seçici engel gibi davranır (Butterworth 1988). Asimetrik membranlar yapıları gereği kirlenmeye karşı oldukça dayanıklıdır.



Şekil 2.3. Gözenek yapılarına göre membranlar (a) simetrik yapı (b) asimetrik yapı

Membran seçiminde, membranın gözenekliliği, gözenek boyutu veya molekül ağırlığı tutma değeri (MWCO), gözenek boyut dağılımı ve gözenek yapısı gibi fiziksel özellikleri ile ayrılacak ortamın fiziksel ve kimyasal özellikleri dikkate alınması gereken parametrelerdir. Çizelge 2.3’de fermentasyon ortamında bulunabilen bazı bileşenler ve partikül büyüklükleri yer almaktadır. İdeal bir membranda, MWCO değerinden küçük olan tüm moleküller membrandan geçerken, diğer moleküller geçemezler. Ancak membranların basit bir şekilde sadece elek gibi düşünülmesi doğru değildir. Proteinler, mikrobiyal hücreler, kolloidler gibi membranla ayrılabilen materyallerin sadece molekül ağırlığı veya boyutu ile karakterize edilmeleri de yeterli değildir. Özellikle, membran yüzeyi ve dispers materyallerin veya partiküllerin, zeta potansiyeleri ve yüzey yük yoğunlukları gibi elektrokinetik özellikleri, membran-partikül arasındaki etkileşimlerin dolayısıyla adsorpsiyonun büyüklüğü ve yapısı

üzerine önemli etkileri vardır (Howell vd 1993). Ayrıca membran yükünün işareti membranın kimyasal yapısı hakkında da bilgi verir. Uygulamalarda, membran yük yoğunluğu ve işaretinin deneyler ile belirlenmesi gerekmektedir. Membran üreticilerinin nadiren membran yükü ve işareti ile ilgili bilgiler vermelerine rağmen bu bilgiler de kesin değildir. Bazı araştırmacıların membran yükü ile ilgili deney sonuçları üreticilerin verdiği bilgilerle uyuşmamakta; literatürde yer alan sonuçlarda çelişkiler ortaya çıkmaktadır. Örneğin, Toray Industries UTC 20 membran yükünün -diğer özelliklerini belirtmeden- pozitif olduğunu bildirmiştir. Membranın çalışma pH aralığı 6-8'dir ve bu pH aralığında pozitif yük taşıdığı kabul edilebilir. Ancak literatürde, UTC 20 membranın amfoterik olduğu ve nötral pH'larda negatif olduğu açıklanmıştır. Ayrıca iyonların membran yüzeyinde tutulması, pozitif membran yükü hakkında bir kanıt değildir (Schaep ve Vandecasteele 2001).

Çizelge 2.3. Fermentasyon ortamındaki bazı bileşenler ve partikül boyutları (O'Sullivan vd 1984)

<b>Partikül Türü</b>	<b>Molekül çapı (nm)</b>
Gözle görülen küçük moleküller	25 000-50 000
Maya ve funguslar	1000-10 000
Bakteriler	300-10 000
Kolloidal maddeler	100-1000
Virusler	30-300
Polisakkaritler (MA=10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> Da)	2-10
Enzimler (MA=10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> Da)	2-5
Organik asitler (100-500 Da)	0.4-0.8

Birçok membran üreticisi ürünlerini gözenek boyutu veya MWCO cinsinden ifade ederler. Bu değerler farklı hidrodinamik çapta veya molekül ağırlığında çeşitli makromoleküllerin veya partiküllerin membranda tutulma (rejection) ölçümleriyle elde edilir. Bu tek değer membran gözenek boyutunun ölçümü için yeterli değildir. Fakat ilk seçim aşamasında ön bilgi oluşturabilir (Cheryan 1998).

Membran üretimi çeşitli yöntemlerle yapılır (Çizelge 2.4). Üretim metodlarının bir kısmı polimerlere, bir kısmı da seramik gibi farklı malzemelere uygulanmaktadır. Üretim sonucunda her biri farklı gözenekliliğe, gözenek boyut dağılımına ve ultrayapıya sahip membranlar üretilir. Örneğin, track-etched metoduna göre üretilen membranlar düşük gözenekliliğe sahipken, faz değişim metoduna göre üretilen asimetrik yapıdaki membranlar yüksek gözenekliliğe sahiptir.

Çizelge 2.4. Sentetik membran üretim yöntemleri

Proses	Materyal
<i>Faz değişim metodu;</i>	
Çözücü buharlaştırma	Selüloz asetat, poliamid
Sıcaklık değişimi	Polipropilen, poliamid
Çökelti oluşturma	Polisülfon, nitroselüloz
<b>Sinterleştirme ve kalıplama</b>	Seramik, metaloksit, polietilen

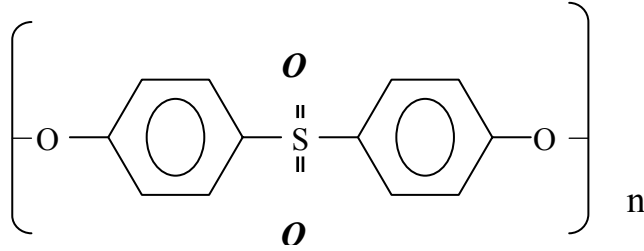
İlk ticari membranlar sellülozik maddelerden yapılmışlardır. Bu membranlar ısı ve pH gibi fiziksel etkilere karşı çok duyarlıdırlar. Günümüzde ise membranlar polisülfon, polietersülfon, poliamid, poliester gibi çeşitli sentetik materyal ve modifiye sellülozdan üretilmektedir. Bu membranların çeşitli çözücü ve sıcaklıklarda güçlü asit ve bazlara karşı dayanıklı oldukları bilinmektedir. Ayrıca membran materyalinin hidrofilik / hidrofobik etkileşimler sonucu çözelti ile tepkime vermemesi, yani kimyasal direncinin de olması gerekir (Shiloach vd 1988).

Bilimsel araştırmalar ve patent literatürü 130'dan fazla materyalin membran üretiminde kullanıldığını bildirmesine rağmen bu materyallerin çok azı ticari ölçekte üretilmektedir ve çoğu basınç etkili ayırma işlemleri için uygun değildir. Ultrafiltrasyon işlemlerinde

en çok kullanılan membranlar polisülfon (PS) ve polietersülfon (PES) membranlar ile selüloz asetat (CA) ve selüloztriasetat (CTA) membranlardır.

### 2.2.1. PES membranlar

PES/PS membranlar, yapısında bulunan tekrarlanan birim difenilsülfon ile karakterize edilirler. Yapısındaki  $-SO_2$  grubu, bitişik aromatik gruplarla arasında rezonans yapan elektronların elektronik çekiminden dolayı, oldukça kararlıdır. Bu gruptan uzak kalan oksijen molekülleri iki çift paylaşılmamış elektronunu protein veya çözücüye vererek güçlü *hidrojen bağları* oluşturabilir. PES membranların tekrarlanan yapısı Şekil 2.4’de gösterilmiştir (Cheryan 1998). PES/PS membranların UF kullanımında avantaj ve dezavantajları aşağıda verilmiştir.



Şekil 2.4. PES membran kimyasal yapısı

#### *Avantajları;*

- Geniş sıcaklık aralığı: 75°C civarında rutin olarak kullanılabilir; bazı üreticiler bu sınırı 125°C’ye kadar çıkartmışlardır. Biyoteknolojik uygulamalar için yüksek sıcaklık sınırı avantajdır .
- Geniş pH aralığı : pH=1-13
- Geniş gözenek boyut aralığı: 10Å(1000 MWCO)-0.2µ

*Dezavantajları;*

- Tabakalı konfigürasyonlarda kullanım için basınç aralığının düşük olması (1.7-7 bar)
- Çeşitli partiküllerle hidrofobik özelliğinden dolayı güçlü etkileşimler yapabilmesi

### **2.2.2. CTA membranlar**

CTA membranlar, ham maddesi selüloz olan klasik membran materyallerindedir. CTA, selülozun asetilasyon reaksiyonları ile üretilir. Şekil 2.5'de selülozun tamamen sübstitüe olmuş selüloztriasetat yapısı gösterilmiştir (Cheryan 1998). CA ve türevi membranların avantaj ve dezavantajları aşağıda verilmiştir.

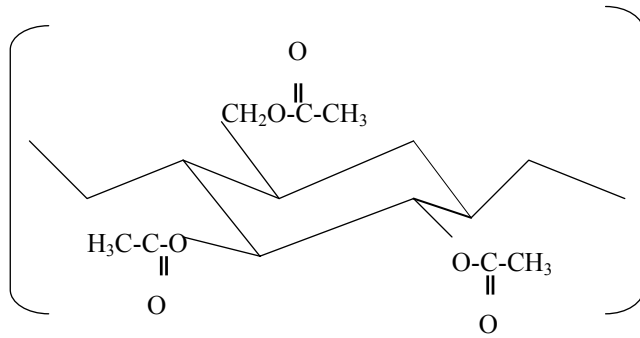
*Avantajları:*

- Hidrofil yapıya sahip olması: Membran kirliliğinin minimize edilmesi açısından önemlidir.
- Yüksek filtrat akısı sağlayacak geniş bir aralıktaki gözenek boyutu ile üretilebilmesi
- Üretimin kolay ve maliyetinin ucuz olması

*Dezavantajları:*

- Sınırlı sıcaklık aralığı: Maksimum çalışma sıcaklığı 30-45°C'dir. Bu akı açısından dezavantajdır. Yüksek sıcaklık difüzyon hızının yüksek ve viskozitenin düşük olmasına neden olduğu için filtrat akısının da artmasına sebep olur. Ayrıca bu sıcaklık aralığında mikrobiyal kontaminasyon görülebilir.
- Sınırlı pH aralığı: Kullanım pH aralığı 3-6 ile sınırlıdır. Polimer yüksek asidik ortamda kolayca hidrolize olur. Asidin,  $\beta$ -glukosidik bağlara eğiliminden dolayı olan hidroliz sonucu membranın molekül ağırlığında ve yapısal bütünlüğünde kayıp meydana gelir. Yüksek sıcaklık bozunmayı hızlandırır.
- Bu tür membranlar selüloz iskeletinin yapısından dolayı biyolojik olarak bozunmaya uğrayabilirler.

Membranların yüksek seçicilik, yüksek mekanik dayanım özelliklerinin olması ve kirlenme ve çözücü etkilerine karşı dayanıklı olmaları gerekir. Çizelge 2.5’de bazı membranlar ve uygulamaları yer almaktadır. Membran ve membran sistemlerinin dünya piyasasındaki satışı yıllık %8 artış ile devam etmektedir. 2000 yılında bu satış miktarı  $5 \times 10^9$ ’ı geçmiştir. Bu ticari değer membran bilim ve teknolojisinin önemini gösteren faktörlerden birisidir.



Şekil 2.5. CTA membran kimyasal yapısı

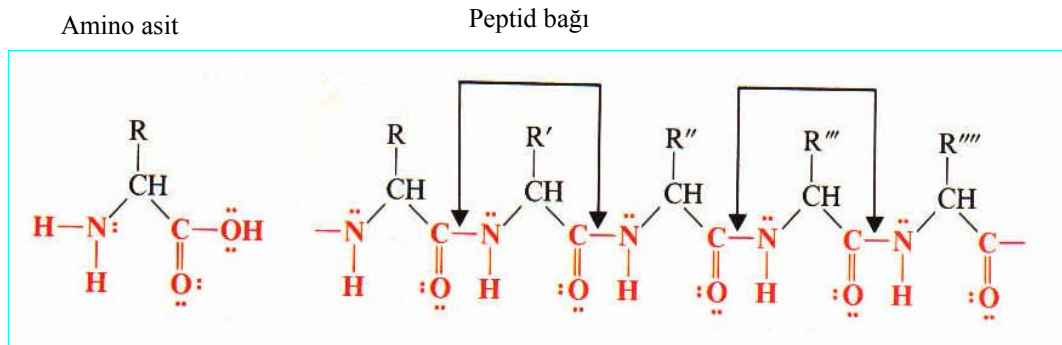
Çizelge 2.5. Bazı membranlar ve uygulamaları (Shiloach vd 1988)

Malzeme	İşlem	pH	MWCO,kDa / Gözenek boyutu,µm
Selüloz asetat	MF,UF, TO	4-8	0.2-0.45
Selüloz triasetat	UF	4-8	5 -10
Polisülfon	MF,UF,TO	1-14	10 -100
Polipropilen	MF	1-14	0.1-0.2
Poliamid	MF,UF,TO	2-12	-

### 2.3. Proteinler

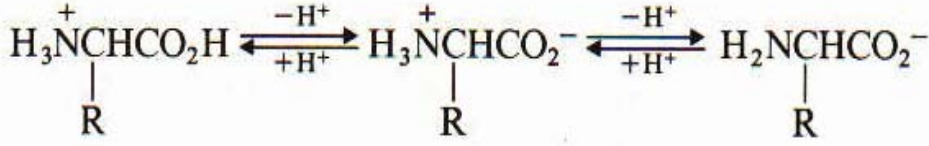
Proteinler hücrede en çok bulunan organik moleküllerdir ve hücrenin kuru ağırlığının %50'sinden fazlasını oluştururlar. Proteinler molekül ağırlıkları birkaç binden milyona varan makromoleküllerdir. Birçok açıdan hücre yapısının ve işlevlerinin temelidir. En basit bir bakteri hücresinde yaklaşık beş bin tür protein bulunmaktadır ve her protein farklı işlevlere sahiptir (Lehninger 1993).

Protein molekülleri, kovalent bağlarla birbirine bağlanarak peptid bağı oluşturan amino asit grupları içeren uzun zincirlerden oluşurlar (Şekil 2.6). Proteinlerde 20 çeşit  $\alpha$ -amino asit bulunur; bunlar hidrofilik veya hidrofobik, asidik, bazik veya nötral olabilen R grupların yapısında farklılık gösterirler (Çizelge 2.6). Proteinler monomerleri olan amino asitler gibi izoelektrik noktaya (pI) sahiptirler. Bu noktada çift tuz özelliği gösterirler ve net yükleri sıfırdır. İsoelektrik noktanın üzerindeki pH değerlerinde negatif (anyon formu), altındaki pH değerlerinde ise pozitif (katyon formu) yük değerlerine sahiptirler (Şekil 2.7) Proteinin polipeptid zinciri, protein konformasyonu olarak adlandırılan, spesifik üç boyutlu bir yapıya katlanır.



Şekil 2.6. Proteinlerdeki polipeptid zincirinin yapısı

Bir protein, polipeptid zincirindeki peptid bağları ve grupları arasındaki kovalent olmayan etkileşimler ile dengede tutulur. Bu kovalent olmayan etkileşimler hidrojen bağları, hidrofobik bağlar ve elektrostatik etkileşimlerdir (Lehninger 1993).



pH < pI (Katyon formu)      pH = pI (Dipolar iyon)      pH > pI (Anyon formu)

Şekil 2.7. Proteinlerin pH'a bağlı olarak farklı iyonlaşma durumları

Amino asit gruplarının alifatik veya aromatik yan zincirlerinin polar olmayan R grupları arasında hidrofobik bağlar oluşur. Bu tür gruplar suda az çözünürler; çünkü bunlar fazla enerji harcamadan, kendilerini su moleküllerinin hidrojen bağlı matrislerine yerleştiremezler. Bu nedenle birlikte tutunma eğilimindedirler ve genellikle protein molekülünün iç kısmında yer alıp aralarında hidrofobik bağlar oluştururlar. Molekülün hidrofobik içi genellikle sudan yoksundur. Tersine molekülün yüzeyi daha çok hidrofildir. Burada amino asitlerin pozitif veya negatif yüklü R gruplarını içeren, birçok polar grup hidratlanır ve bunlar proteini çevreleyen su molekülleri ile temastadır. Böylece proteinin yüzeyi, iyonik grupların sayısına, türüne ve çözücünün pH'ına bağlı olarak nötral, pozitif veya negatif olabilen, net bir elektrik yüküne sahiptir. Bu yük değeri protein-membran etkileşimlerinin açıklanması ve ayırma performansının artırılması açısından anahtar değişkenlerden biridir.

Çizelge 2.6. R-gruplarına göre amino asitlerin sınıflandırılması

R-grubu	Amino asitler
Polar olmayan	Glisin, Alanin, Valin, Lözin, İzölözin, Pirolin
Aromatik, polar olmayan	Fenilalanin, Trozin, Triptofan
Kükürt içeren	Sistein, Metiyonin
Polar	Serin, Treonin
Amid içeren	Asparajin, Glutamin
Bazik	Lizin, Arjinin, Histidin
Asidik	Aspartik asit, Glutamik asit

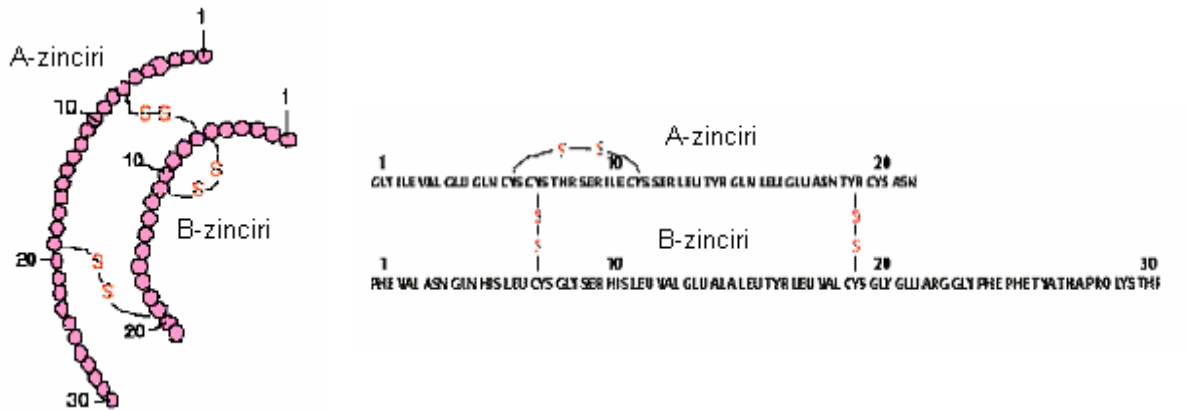
Proteinler üç boyutlu karakteristik bir yapıya sahiptir ve özgün yapılarına (konformasyon) göre proteinler ipliksi ve küresel olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

*İpliksi proteinler*, tek bir eksen boyunca paralel yerleşmiş uzun iplik veya şerit şeklindeki polipeptid zincirlerinden oluşur. İpliksi proteinler, fiziksel olarak sağlamdır; su veya tuzlu suda çözünmezler. İpliksi proteinler yüksek organizmaların özellikle bağlantı dokularında temel yapı elemanlarıdır. Elastik bağlantı dokularındaki elastin, tendon ve kemik dokusu üzerindeki kollajen; saçta, tırnakta, deride bulunan  $\alpha$ -keratin ipliksi proteinlere örneklerdir.

*Küresel proteinlerde* ise polipeptid zincirleri küre şeklinde sıkı olarak sarılmışlardır. Küresel proteinlerin çoğu suda çözünür; hücre içinde genellikle dinamik işleve sahiptirler. Enzimlerin hemen tümü, hormonların bir kısmı, antikorlar, serum albumin ve hemoglobin gibi taşınım işlevi olan proteinler, küresel proteinlerdir.

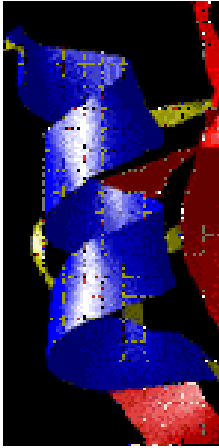
Bir protein molekülü, birbirini tamamlayan dört yapının sonucu olarak oluşur ve bu yapıları ile belirginleşmektedir.

**Protein moleküllerinin birincil (primer) yapısı:** Amino asitlerin belli bir sıraya göre peptid bağları oluşturarak dizilmesi ve bu zincirin bazı noktalarda yan zincirler de oluşturabilmeleri sonunda proteinlerin primer yapıları oluşur. Şekil 2.8’de insülin hormonu için primer yapı gösterilmiştir.

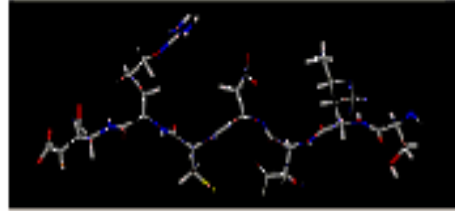
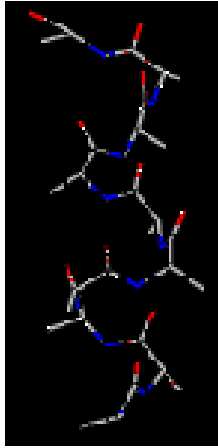


Şekil 2.8. İnsülin hormonunun birincil yapısı

**Protein moleküllerinin ikincil (sekonder) yapısı:** Polipeptid zincirlerinin düzenli, ardışık tekrarlı tek boyutta sıralanması ile oluşur. Sekonder yapı özellikle iplikli proteinlerde önemlidir; polipeptid zincirler aksel veya sarmal yapıdadır. Bu yapı küresel proteinlerin polipeptid zincirlerinin bazı kısımlarında da görülür. Polipeptid zinciri ribozomdan ayrılmadan önce, kendiliğinden katlanmaya başlar. Önce, polipeptidin bazı kısımları,  $\alpha$ -heliks denilen düzgün bir helikal yapıya sarılmış olur ve diğer bölgeleri  $\beta$ -yaprak adı verilen bir zigzag formda gerilmiş kalır. Genelde amino asitlerden alanin, glutamik asit, lözin ve metiyoninin varlığı,  $\alpha$ -heliksin varlığını desteklerken, pirolin, glisin, tirozin ve serin bunu inhibe eder. Daha sonra bütün molekül, spesifik bir üç boyutlu şekle bürünür. Şekil 2.9'da ribonükleaz enziminin ikincil yapısı gösterilmiştir.



$\alpha$ -heliks yapı

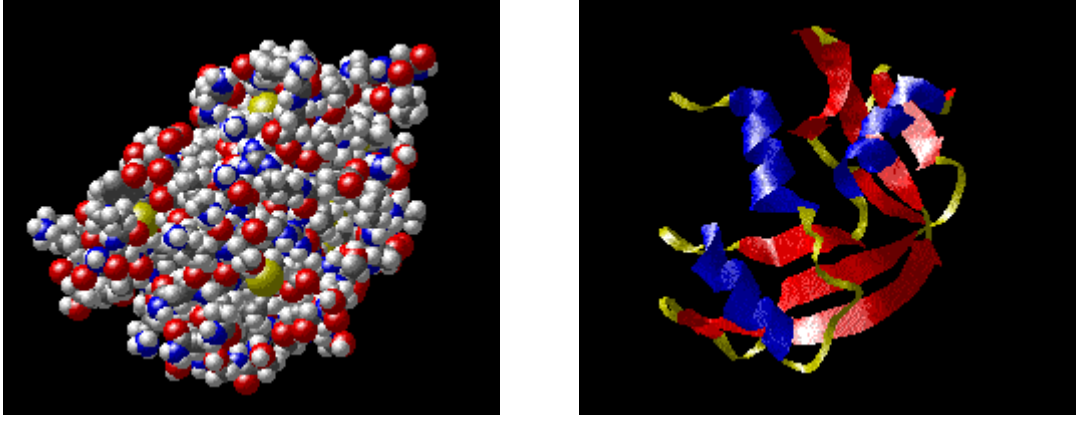


$\beta$ -yaprak yapı

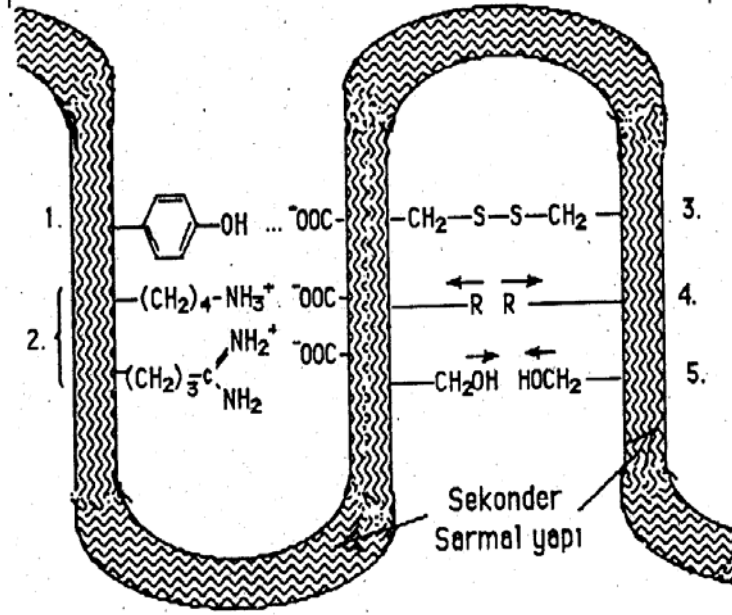
Şekil 2.9. Ribonükleaz-A enziminin ikincil yapısı

**Protein moleküllerinin üçüncül (tersiyer) yapısı:** Uzun polipeptid zincirinin üç boyutta, birbiri üzerine kıvrılıp, katlanmasıyla meydana gelir; böylece proteinlerin sıkıca sarılmış küresel yapısı ortaya çıkar (Şekil 2.10). Tersiyer yapının kararlılığı molekül içi etkileşimlere bağlıdır. Şekil 2.11'de hidrojen bağları, iyonik bağlar, disülfür bağları gibi molekül içi etkileşimler gösterilmiştir. Hidrojen bağları, hem sekonder yapının hem de tersiyer yapının kararlılığında önemlidir. Farklı polipeptid zincirleri

birbirlerine C=O...HN bağlarıyla bağlanır. Aynı zamanda tirozinin fenol grubu OH'ları ile yan zincirdeki karboksilat anyonu arasında da hidrojen bağları oluşabilir. İyonik bağlar, lizinin amonyum katyonu ile yan zincir karboksilat anyonu veya arjininin guanidin katyonu ile karboksilat anyonu arasında oluşur. Disülfür bağları, kovalent yapıda olup tersiyer yapının kararlılığında en büyük role sahiptirler. Aynı polipeptid zincirinin içinde bulunabileceği gibi farklı polipeptid zincirleri de birbirlerine bağlayabilirler. Hidrofob kuvvetler, amino asitlerin R grubunun alifatik veya aromatik bir hidrokarbon olması durumunda oluşurlar. Bu gruplar molekülün iç kısmına doğru itilerek proteinin en uygun konformasyonu alması sağlanır.

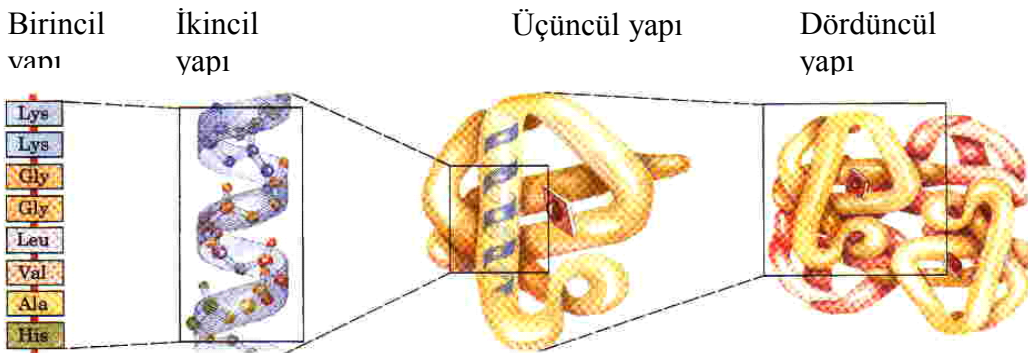


Şekil 2.10. Ribonükleaz A enziminin üçüncül yapısı



Şekil 2.11. Proteinler tersiyer yapılarının kararlılığında rol oynayan etkileşimler  
 1- hidrojen bağları, 2-iyonik bağlar, 3- disülfür bağları, 4-hidroforb kuvvetler,  
 5- dipol-dipol etkileşimleri

**Protein moleküllerinin dördüncül (kuaterner) yapısı:** İki veya üç zincirli polipeptid zincirlerinin birbirleriyle ilişkili olarak düzenini belirtir (Şekil 2.12). Dördüncül yapı özellikle enzimlerde önem taşımakta ve enzim aktiviteleri üzerinde etkin olmaktadır (Lehninger 1993).



Şekil 2.12. Proteinlerin yapı seviyeleri

Bu doktora çalışmasında model proteinlerden biri olarak seçilen ve suda çözünebilen küresel bir protein olan bovin serum albumin (BSA) karaciğerde günde 3-4 g kadar sentezlenmektedir. Hücre dışı ozmotik basıncın %80'ini sağlar, ayrıca çözünmeyen birçok bileşikle -yağ asitleri, billuribin, aspirin ve kumarin türevleri- özgül olmayan çözünen kompleksler vererek kanda taşınımını sağlamaktadırlar. BSA'nın molekül ağırlığı 67 kDa, izoelektrik noktası pH=4.7-4.9'dur (Jones vd 2000). Çalışmada kullanılan diğer model protein serin alkali proteaz (SAP) enzimidir. Peptit bağlarını hidrolize eden proteaz enzimleri toplam ticari enzim üretiminin %60'ını oluşturmaktadır. Serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik ve metallo proteazlar olarak sınıflandırılan proteaz enzimlerinin deterjan endüstrisinde kullanılan miktarı, mikrobiyal enzim üretiminin %35'ini oluşturmaktadır. Serin proteazların aktif konumlarında bulunan *serin grupları* tepkimelerin katalizlenmesinde rol oynar. Serin alkali proteazlar tahıl, bira, şarap, hayvan yemi, balık, et, süt ve deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadırlar. SAP enziminin molekül ağırlığı 27.5 kDa'dur, genelde nötral ve alkali pH değerlerinde aktiftirler; izoelektrik noktaları pI=9'dur (Kalisz 1988).

#### **2.4. Protein-Membran Etkileşimleri**

Membran ayırma performansını belirleyen anahtar özellikler; yüksek filtrat akısı ve seçicilik, işletme şartlarına bağlı olarak yüksek mekanik, kimyasal ve ısı kararlılık, kirliliğe karşı dayanım, maliyet açısından uygunluktur. Membran geçiş basıncı, çapraz akış hızı ve çözelti derişimi filtrat akısını etkileyen önemli işletme parametreleridir. Geliştirilen proseslerde uygun membran yapısı ve kombinasyonları ayarlanarak ve işletme parametreleri optimize edilerek yüksek filtrat akısı sağlanmaya çalışılmaktadır.

Membranla ayırma işlemlerinin gözenekli bir yapı üzerinde gerçekleşmesi, proteinlerin oluşturduğu kolloidal çözeltilerin membran yüzeyinde ve gözenek içinde ara yüzey etkileşimlerine sebep olması, protein-membran etkileşim mekanizmasını karmaşık hale getirmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda klasik modeller -direnç modeli, geri

akış modeli ve ozmotik basınç modeli- ile filtrat akısında meydana gelen azalma açıklanmaya çalışılmıştır. Modellerde akıdaki azalmanın sebepleri farklı şekillerde belirtilmiştir. Geri akış modeline göre akıdaki azalmanın nedeni kek tabakasının hidrolik direncinin artmasıdır. Direnç modeline göre akı azalması kirlilik, partikül adsorpsiyonu veya derişim polarizasyonunun sebep olduğu dirençler nedeniyledir. Ozmotik basınç modeline göre ise bu azalmaya, membran yüzeyinde kalan partiküllerin ozmotik basınçlarının artarak etkin membran geçiş basıncının azalması sebep olmaktadır (Bhattacharjee ve Datta 1997).

Literatürde yer alan çalışmalarda membranlarda *taşınım mekanizmasının* analizi, sterik etkileşimler dikkate alınarak yapılmıştır. Sterik etkileşimler, çözeltiden makromoleküllerin ayrılmasında ve makromoleküllerden büyük partikül ve hücrelerin ayrılmasında etkin olarak kullanılmaktadır. Biyoteknoloji endüstrisinde membran sistemleri, hücre süspansiyonundan proteinlerin ayrılmasında ve tamponun uzaklaştırılarak proteinin deriştirilmesinde kullanılmaktadır. Ancak protein-protein ayrılması için tamamen sterik etkileşime dayalı yüksek seçimlilik elde etmek mümkün değildir (Zydney ve Pujar 1998). Membran sistemlerinin performansını artırmak için membran ve proteinin zeta potansiyeli/yüzey yükü gibi elektrokinetik özelliklerine, çözelti pH'ı ve iyonik gerilimi gibi çözelti özelliklerine ve membran materyaline dikkat edilmelidir.

Proteinin membrana adsorpsiyonu ve proteinin agregasyona uğraması sonucunda temelde iki mekanizmayla oluşabilen protein kirliliğinin azaltılması için şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, çeşitli işletme parametreleri araştırılarak kirliliği minimize eden koşullar belirlenmesine rağmen kirliliğin mekanizması hakkında genel bir görüş geliştirilememiştir. Protein-membran sistemlerinin kirlilik özelliklerini araştıran çalışmalarda gerçek fiziksel ve kimyasal olaylar hakkında kesinlik olmamakla birlikte, protein-membran ara yüzey etkileşimleri ile protein denatürasyonu ve agregasyonunun membran kirliliğini hızlandırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Maruyama vd 2001, Kelly ve Zydney 1994).

UF sisteminde protein-protein ve protein-membran etkileşimleri sonucunda meydana gelen adsorpsiyon, derişim polarizasyonu ve agregasyon membran yüzeyinde (external fouling) ve/veya gözenekler içinde (internal fouling) tersinir/tersinmez kirliliğe sebep olmaktadır. Kirlilik nedeniyle oluşan akıdaki azalma, derişim polarizasyonundan doğan azalmadan farklıdır. Derişim polarizasyonu tersinir bir olaydır; kirlilik ise tersinmezdir. Klasik modellerle moleküler düzeydeki bu etkileşimleri her zaman açıklamak mümkün değildir. Bu nedenle protein-membran (adsorpsiyon) ve protein-protein (agregasyon) etkileşimlerinin göz önüne alınarak kirlilik mekanizmasının daha iyi anlaşılabilir kirliliğin kontrol altına alınması, ayırma performansının artırılması için sistemde rol oynayan ara yüzey kuvvetlerinin belirlenmesi, etkileşim mekanizmalarının ortaya konulması ve bu etkileşimler ile ayrılacak molekül ve membranın fizikokimyasal özelliklerini içeren yeni modellerin geliştirilerek moleküler seviyede yeni sentezlerin yapılması gerekmektedir.

#### **2.4.1. Adsorpsiyon**

Endüstriyel proseslerde kullanılan membranların gerçek materyal ve kimyasal yapısının bilinmesi, yüzeydeki fonksiyonel gruplar membranın fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlediği için önemlidir. Membran yüzeyinin kimyasal yapısı, proteinlerin yüzey üzerine adsorpsiyon mekanizmasının aydınlatılması için temeldir. Ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon membranların yüzey morfolojileri komplekstir, yüzeylerinde sonsuz sayıda gözenek bulunmaktadır. Bu nedenle adsorpsiyon, membran yüzeyinin farklı yerlerinde meydana gelebilir. Parametrelerin kontrolü veya temizleme proseslerinin tasarımı için, ayırma işlemi sırasında adsorpsiyon konumunun ve mekanizmasının bilinmesi önemlidir (Pihlajamäki vd 1998).

Proteinler katı ara yüzeyler için yüksek afiniteye sahiptirler. Bu, proteinlerin büyük boyutlarından dolayı bağ yapma olasılığının fazla olması ve amino asit kalıntılarının heterojenliğinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca izoelektrik noktaya sahip olmaları,

çözeltideki difüzyon hızlarının düşük olması, Tyndall ışınması yapmalarından dolayı proteinler koloidal yapıda makromoleküllerdir. Bu nedenle proteinler elektrostatik, van der Waals ve hidrofobik etkileşimler gibi membran yüzeyine adsorpsiyon ile sonuçlanan koloidal ara yüzey etkileşimleri gösterirler.

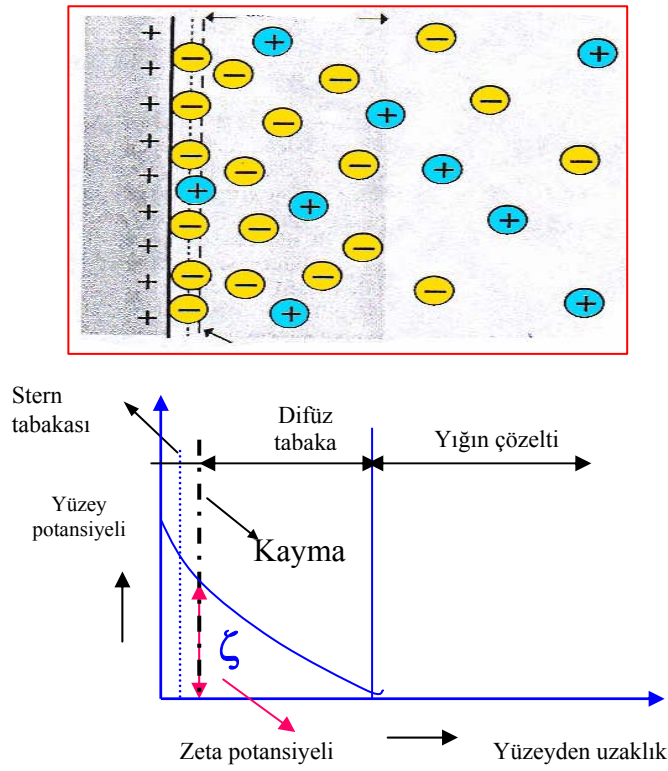
#### 2.4.1.1. Elektrostatik etkileşimler

Elektrostatik kuvvetlerin matematik ifadesi Poisson-Boltzmann dağılımı temeline dayanır. Bu ilişkiyi tanımlamak için partikül yüzey yükü, potansiyeli ve geometrisini içeren çeşitli modeller geliştirilmiştir. Elektrostatik etkileşimler, yüklü yüzeylerin difüzyon tabakaları arasında meydana gelmektedir.

İletkenlik özelliği olan bir sıvı ile temasta bulunan makropartiküllerin yüzeyinde, sıvı fazdan iyon adsorpsiyonu ya da partikül yüzeyinde bulunan grupların iyonlaşması sonucunda bir yük oluşur. Bu şekilde partikülün katı yüzeyi ile sıvı faz arasında bir potansiyel fark meydana gelir. Zeta potansiyeli ( $\zeta$ ), partikül ve onu çevreleyen ortam arasındaki etkin sınırdaki ortaya çıkar ve katı partikülün yüzey yükünün bir ölçüsüdür. Belli bir yük değeri kazanmış olan partikülün çevre ile etkileşimi, elektrostatik çekme-itme veya van der Waals kuvvetleri aracılığı ile oluşur. Ara yüzey etkileşimleri olan sistemlerde zeta potansiyeli ve yüzey yük yoğunluğunun ( $\sigma$ ) belirlenmesi, yüzeyin yapısı hakkında bilgi vermenin yanında elektrostatik etkileşim kuvvetlerinin kantitatif olarak belirlenmesi için de gereklidir.

Pozitif yüklü bir yüzey, elektrolit ile temas ettiği zaman çözelti içindeki negatif yüklü iyonları kendisine doğru çeker (Şekil 2.13). Negatif yüklü iyonların oluşturduğu bu sınır tabakasına **Stern tabakası** denir. Elektronötralliyeti sağlamak için iyonlar tarafından Stern tabakasına bitişik olarak oluşan yaygın tabakasına ise **difüzyon tabakası** denilmektedir. Difüzyon tabakada iyon dağılımı elektrostatik kuvvetlerin dengesi ve

rastgele ısı hareketlerle belirlenmektedir. Bu iki tabakaya birden **elektriksel çift tabaka**/Debye uzunluğu denilmektedir. Katı yüzey ile yığın arasında meydana gelen potansiyel fark Stern tabakasında, yüzeyden uzaklık mesafesi ile doğrusal bir şekilde azalırken, difüz tabakada bu azalma üstel olarak devam eder ve bu şekilde bir potansiyel eğrisi oluşur. Partikül sıvı içinde hareket ettiği zaman Stern tabakası kayar ve bir **kayma düzlemi** oluşur. Kayma düzleminin potansiyel eğrisini kestiği nokta zeta potansiyelini ( $\zeta$ ) verir ve yüzeyin elektriksel özelliklerini belirlemek için kullanılır .



Şekil 2.13. Pozitif yüklü bir yüzey ile yığın arasındaki iyon dağılımının şematik gösterimi ve zeta potansiyelinin tanımı

Zeta potansiyeli ölçümü için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, hareket sebebiyle veya hareket sonucunda oluşan elektrik alanında yüklü yüzeyin ve onu çevreleyen sıvının hareketini içermektedir. Yöntemler, yürütücü kuvvetlerine göre ikiye ayrılırlar (Çizelge 2.7). Elektroforez ve elektroosmoz olaylarında yürütücü kuvvet

uygulanan elektriksel alandır ve bu alan mekanik bir akı oluşturur. Akım potansiyeli ve sedimentasyon potansiyeli ölçümü yöntemlerinde ise yürütücü kuvvet mekanik olarak sağlanan akıdır. Bu yöntemlerde mekaniksel akı bir elektrik alan oluşmasına sebep olur. Sedimentasyon potansiyeli ölçümünde, yer çekimi kuvvetinin etkisiyle durgun sıvı faza doğru yüklü partiküllerin hareket etmesinden yararlanır.

Çizelge 2.7. Zeta potansiyeli belirleme yöntemlerinin sınıflandırılması (Birdi 1997)

<i>Yürütücü Kuvvet</i>		
	<b>Elektriksel alan</b> <i>(Mekanik bir akı oluşturur)</i>	<b>Mekaniksel Akı</b> <i>(Elektriksel bir alan yaratır)</i>
Katı faz hareketsiz	Elektroosmoz	Akım Potansiyeli
Katı partikül veya sıvı damlaları hareketli	Elektroforez	Sedimentasyon Potansiyeli

*Akım potansiyeli ölçümü* membran-elektrolit ara yüzeyinin elektrokinetik karakterizasyonu için kullanılan yaygın deneysel bir yöntemdir.

Membran yüzeyindeki yük, gözeneklerdeki çift tabakada membran yükü ile ters işaretli olan zıt yüklü iyonların (counter-ion) toplanmasına sebep olur. Bu iyonlar uygulanan basınç ile kayma düzlemini sıyırarak ilerler. Sonuçta zıt yüklü iyonlar gözenek çıkışında birikerek bir elektriksel potansiyel/akım potansiyeli oluştururlar. Bu akım potansiyeli, zıt yüklü iyonları akış yönünün tersi yönünde, aynı yüklü iyonların (co-ion) ise akış yönünde taşınımını sağlar. Yatışkın halde -elektronötraliyenin sağlanması açısından bu iyon akıları dengeye ulaşır. (Huissman ve Traghard 1999, Burns ve Zydney 2000, Ariza 2001).

Sabit bir basınç farkında ölçülen potansiyel fark ile zeta potansiyeli arasındaki ilişki Helmholtz-Smoluchowski eşitliği (Eşitlik 2.4) ile verilmektedir (Burns ve Zydney 2000).

$$\frac{dE}{d\Delta P} = \frac{\varepsilon_o \varepsilon_r \zeta}{\eta \Lambda_o} \quad (2.4)$$

Burada  $\zeta$ ; zeta potansiyeli (V),  $\eta$ ; viskozite (kg/m.s),  $\varepsilon_r$ ; ortamın dielektrik sabiti (78.5),  $\varepsilon_o$ ; ortam geçirgenliği ( $8.85 \times 10^{-12}$  C/Vm),  $\Lambda_o$ ; ortamın iletkenliği (S/m), E; akım potansiyeli (V) ve  $\Delta P$ ; basınç farkıdır (N/m<sup>2</sup>).

Kayma düzlemindeki elektrokinetik yüzey yük yoğunluğu veya yüzey yük yoğunluğu zeta potansiyeli verileri kullanılarak Gouy-Chapman eşitliğinden (Eş. 2.5) elde edilebilir (Ariza 2001).

$$\sigma_p = 4C_o F \kappa^{-1} \sinh\left(\frac{F\zeta}{2RT}\right) \quad (2.5)$$

Burada  $\sigma_p$ ; yüzey yük yoğunluğu (C/m<sup>2</sup>),  $C_o$ ; yığın elektrolit derişimi (M),  $F$ ; Faraday sabiti 96 500 (Coulomb/mol),  $R$ ; ideal gaz sabiti (8.314 J/mol K) ve  $T$ ; mutlak sıcaklıktır (K). Çift tabaka kalınlığı  $\kappa^{-1}$  (m), iyonik gerilime bağı olarak Eşitlik 2.6 ile ifade edilir.

$$\kappa^{-1} = \left( \frac{F^2}{\varepsilon_o \varepsilon_r RT} \sum z_i^2 C_i \right)^{-1/2} \quad (2.6)$$

Buradaki  $z_i$  ve  $C_i$  iyonların değerlik ve derişim değerleridir.

Helmholtz-Smoluchowski eşitliğinde uygulanan basınç farkı ve ölçülen akım potansiyeli arasında lineer bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca bu eşitliğin geçerli olabilmesi için gözenek içinde çift tabakalar üst üste gelmemeli; yani gözenek

yarıçapının ( $r_p$ ) Debye uzunluğuna/çift tabaka kalınlığına ( $\kappa^{-1}$ ) oranı büyük olmalıdır. Başka bir ifade ile Helmholtz-Smoluchowski eşitliği  $\kappa r_p \gg 1$  olduğu durumda geçerlidir (Combe vd 1999, Burns ve Zydney 1999 ).

*Proteinlerin* zeta potansiyelleri ise elektroforez yöntemi ile elektriksel bir alanda proteinlerin hareketliliklerinin ölçümlerinden yararlanarak (Menon ve Zydney 2001) belirlenebildiği gibi teorik olarak da hesaplanabilir. Proteinlerin net yüklerinin teorik olarak belirlenebilmesinde asit-baz dengesine dayalı olarak türetilmiş olan Handerson-Hasselbach (Alexov 2000) eşitliği kullanılmaktadır (Eş. 2.7).

$$Z = \sum_{i=1}^N \frac{10^{-\gamma(i)(pH-pKa(i))}}{1 + 10^{-\gamma(i)(pH-pKa(i))}} \quad (2.7)$$

Burada  $Z$ ; proteinin net yükünü,  $pKa$ ; proteinin yapısındaki iyonlaşabilen amino asitlerin ayrışma sabitini göstermektedir. Amino asitin asidik ya da bazik karakterine göre  $\gamma(i) = -1$  veya  $+1$  değerini almaktadır. Çizelge 2.8’de proteinde iyonlaşabilen amino asitler ve ayrışma sabitleri verilmiştir.

Net yük değerinden proteinin zeta potansiyeline geçmek için Eş.2.8’ile verilen lineerleştirilmiş Poisson-Boltzmann eşitliğinden yararlanılır (Menon ve Zydney 1999) .

$$\zeta = \frac{eZ}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_s (1 + \kappa r_s)} \quad (2.8)$$

Burada  $e$ ;elektronik yük ( $1.6 \times 10^{-19}C$ ),  $Z$ ; protein net yükü,  $r_s$ ; proteinin yarıçapı (m),  $\kappa$ ; çift tabaka kalınlığının tersi ( $m^{-1}$ ),  $\zeta$ ; proteinin yüzey potansiyeli (V)’dir.

### 2.4.1.2. van der Waals kuvvetleri

van der Waals veya London kuvvetleri bir atom veya moleküldeki elektronların serbest hareketleri sonucu oluşur. Atom içinde elektron yoğunluğu, ortalama olarak küresel simetrik olduğu halde, herhangi bir anda atomda yük dağılımı değişebilir. Atomun bir tarafında diğer tarafından daha fazla yük oluşu, komşu atomdaki yük dağılımını da değiştirir ve böylece geçici dipoller oluşur. Bu dipoller kaybolmadan yeni dipoller oluştururlar. Geçici dipoller arasındaki çekme güçlü olmakla beraber, oluşma süreleri kısa olduğundan van der Waals kuvvetleri moleküller arası en zayıf etkileşimlerdir. Ancak büyük atomlarda veya moleküllerde geçici dipol oluşması daha uzun süreli olduğundan van der Waals kuvvetleri daha büyüktür.

Çizelge 2.8. Bir proteinde iyonlaşabilen amino asitler ve ayrışma sabitleri

Grup	Asit ↔ Baz + H <sup>+</sup>	pKa
Terminal karboksil	$\text{—COOH} \rightleftharpoons \text{—COO}^- + \text{H}^+$	3.10
Aspartik asit (β-COOH)	$\text{—COOH} \rightleftharpoons \text{—COO}^- + \text{H}^+$	3.65
Glutamik asit (γ-COOH)	$\text{—COOH} \rightleftharpoons \text{—COO}^- + \text{H}^+$	4.25
Histidin (İmidazol)	$\text{—CH}_2\text{—} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{HN}^+ \\ \diagdown \\ \text{NH} \end{array} \rightleftharpoons \text{—CH}_2\text{—} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{NH} \end{array} + \text{H}^+$	6.00
Terminal amino	$\text{—NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{—NH}_2 + \text{H}^+$	8.00
Sistein (Tiyol)	$\text{—SH} \rightleftharpoons \text{—S}^- + \text{H}^+$	8.18
Tirozin (Fenol)	$\text{—} \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4 \\ \text{OH} \end{array} \rightleftharpoons \text{—} \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4 \\ \text{O}^- \end{array} + \text{H}^+$	10.0
Lizin (C-amino)	$\text{—NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{—NH}_2 + \text{H}^+$	10.0
Arginin (Guanidyum)	$\text{—N—C} \begin{array}{l} \text{=NH}_2^+ \\ \text{=NH} \\ \text{=NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \text{—N—C} \begin{array}{l} \text{=NH} \\ \text{=NH} \\ \text{=NH}_2 \end{array} + \text{H}^+$	12.0

### 2.4.1.3. Ara yüzey etkileşim enerjilerinin hesaplanması: DLVO teorisi

Kolloidal etkileşimlerin kantitatif olarak tanımlanması için ilk çalışmalar Rusya (Derjaguin ve Landau 1941) ve Hollanda'da (Verwey ve Overbeek 1948) yapılmış ve kolloid kimyasında önemli uygulama alanı olan DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) teorisi türetilmiştir (Grasso vd 2002).

Birbirine çok yakın moleküller arasındaki elektromanyetik dalgalamalar bir diğerinin yük polarizasyonuna neden olur. Yüklü iki yüzey arasında etkileşimin şiddetini belirlemek için iki kuvvetin (elektrostatik ve van der Waals kuvvetleri) birlikte etkisi DLVO teorisi ile incelenebilir. Membran ile küresel makromolekül (protein) arasındaki elektrostatik etkileşim enerjisi ( $E_e$ ) Eşitlik 2.9 ile ifade edilir (Howell vd 1993).

$$E_e = \epsilon_r \epsilon_o r_s (\zeta_1^2 + \zeta_2^2) \left\{ \frac{2\zeta_1 \zeta_2}{\zeta_1^2 + \zeta_2^2} \ln \left[ \frac{1 + \exp(-\kappa H)}{1 - \exp(-\kappa H)} \right] + \ln[1 - \exp(-2\kappa H)] \right\} \quad (2.9)$$

Burada;  $\zeta_1$  ve  $\zeta_2$ ; membran ve protein zeta potansiyeli,  $r_s$ ; küresel makromolekül yarıçapı,  $H$ ; protein ve membran arasındaki ayırma mesafesidir ( $H \ll r_s$ ). Bu etkileşimin büyüklüğü, potansiyelin işaretine bağlı olarak pozitif veya negatif olabilir.

van der Waals etkileşim enerjisinin ( $E_w$ ) büyüklüğü ise Eşitlik 2.10 ile verilmiştir.  $A$ , sistemin etkin Hamaker sabitidir ve protein, yüzey ve çözücü arasındaki net van der Waals etkileşimini belirler.

$$E_w = -\frac{A}{6} \left[ \frac{2r_s(H + r_s)}{H(H + 2r_s)} - \ln \left( \frac{H + 2r_s}{H} \right) \right] \quad (2.10)$$

Elektrostatik ve van der Waals etkileşimlerinin toplamı, adsorpsiyonla sonuçlanan itme veya çekme olaylarını belirler. Çekme olduğu durumda bu toplamın işareti negatiftir. İtme kuvvetlerinin etkin olduğu durumda ise toplam enerji pozitifdir. Düşük iyonik gerilimlerde elektrostatik kuvvetler güçlü, yüksek iyonik gerilimde ise elektrostatik kuvvetler zayıftır.

#### 2.4.1.4. Hidrofobik kuvvetler

Proteinler gibi hidrofob grupları bulunan makromoleküller, hidrofob yapıdaki membranlara kolayca adsorplanırlar. Hidrofil yapıdaki membranlarda ise adsorpsiyon ve kirlilik daha az görülür. Hidrofobik bir yüzeyden adsorplanmış tabakayı uzaklaştırmak, hidrofilik yüzeye kıyasla daha güçtür. Proteinler hidrofobik bir yüzeye adsorplandığında, hidrofilik yüzeye adsorplandığı duruma göre daha sıkı bir yapı oluştururlar. Hidrofobik yüzeye adsorplanan protein kendi hidrofobik kısımlarını yüzeye birleştirerek yapısını değiştirme eğilimine girer. Adsorpsiyondan sonra molekül, konformasyonunu en uygun hale getirmeye çalışır.

Hidrofobik kuvvetlerin yapısı van der Waals ve elektrostatik etkileşim kuvvetlerinden farklıdır. Hidrofobik kuvvetlerin ifadesiyle ilgili genel bir görüş geliştirilememesine rağmen, hidrofobik etkileşimlerin film kalınlığının artması ile üstel olarak azaldığı bilinmektedir. Film kalınlığı başına hidrofobik enerji Eşitlik 2.11 ile ifade edilmektedir (Birdi 1997).

$$E_{hidrofob} = -2 \gamma e^{\frac{h}{\lambda_0}} \quad (2.11)$$

Burada h, film kalınlığını,  $\gamma$  (10-50 mJ/m<sup>2</sup>) ve  $\lambda_0$  (1-2 nm) sabitleri göstermektedir.

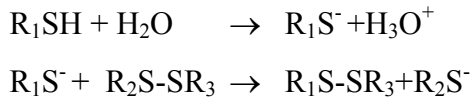
Su molekülleri hidrofilik yüzeylerle hidrojen bağı oluşturur. Bu düzenli yapının diğer bir yüzeyin yaklaşımı ile bozulması enerji açısından uygun değildir. Protein adsorpsiyonu entropinin artışı ile meydana gelir. Başka bir deyişle adsorpsiyonun yürütücü kuvveti entropideki artıştır. Bu artış, protein ve membran yüzeyinden su moleküllerinin desorpsiyonuna sebep olmaktadır. Bu etki, su ile yüzey arasındaki etkileşimleri oldukça düşük olan hidrofobik yüzeylerde bile güçlüdür.

#### **2.4.2. Agregasyon**

Proteinler molekül içi etkileşimlerin yanında yüzeylerinde farklı özellikte amino asit grupları bulunması ve bu grupların pH'a bağlı olarak belli yük değerlerine sahip olmaları nedeniyle ayırma işlemi sırasında temasta oldukları membran ile çeşitli etkileşimler gösterirler. Biyokolloid olarak adlandırılan proteinlerin sulu çözeltideki davranışları diğer kolloidal partiküllerin davranışlarına benzerdir ve çözelti içinde elektrostatik, van der Waals ve hidrofobik etkileşimler olarak bilinen uzun mesafeli kuvvetlerden (long-range forces) etkilenirler. Kimyasal ve hidrojen bağlarından kaynaklanan kısa mesafeli kuvvetler (short-ranges forces) kolloidlerin yüzeyleri moleküler mesafede yaklaştığı zaman ortaya çıkar. Proteinler diğer kolloidlerle birçok ortak özelliğe sahip olmalarına rağmen gösterdikleri etkileşimler daha komplekstir. Proteinlerin bir yüzeye bağlandıklarında konformasyonunun değişmesi buna örnek olarak verilebilir (Garcia vd 1999).

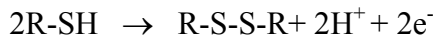
Protein molekülünün agregasyonu, denatürasyon ve buna ardışık agregasyon basamaklarıyla açıklanabilir. Denatürasyon, proteinin üç boyutlu yapısının pH, sıcaklık, iyonik gerilim, kesme gerilimi ve adsorpsiyon nedeniyle bozulmasıdır. Denatürasyon, protein-protein ve protein-çözücü arasındaki etkileşimlerin dengesini değiştirerek proteinin hidrofobik, van der Waals kuvvetleri veya disülfür bağları aracılığı ile agregasyonuna sebep olur.

UF membranlarda protein agregasyonu ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda model bir protein (BSA) seçilerek agregasyon mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır. BSA molekülü 35 adet sistein kalıntısı içermektedir. Bu kalıntılardan 34'ü kendi aralarında 17 adet molekül içi disülfür bağı oluşturarak kovalent olarak bağlanır. BSA molekülünde geriye kalan sistein kalıntısı ise serbest tiyol grubu oluşturur (Maruyama vd 2001). Tiyol-disülfür reaksiyonu disülfür bağı üzerindeki merkaptid iyonu (iyonlaşmış tiyol grubu;R-S<sup>-</sup>) tarafından nükleofilik olarak gerçekleşmektedir:

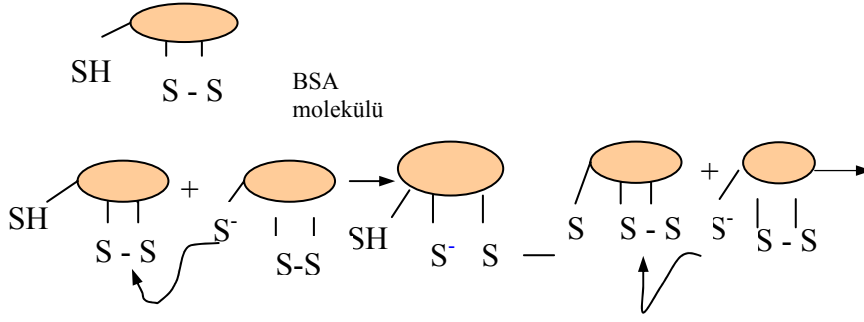


BSA molekülü üzerindeki serbest kükürt/sülfidril grupları komşu molekülündeki disülfür grubuyla moleküller arası disülfür bağı oluşturmak için reaksiyon verir ve reaksiyon sonucunda yeni bir serbest tiyol grubu oluşur. Oluşan bu yeni tiyol grubu birinci BSA molekülü içindeki diğer bir disülfür bağıyla reaksiyon vererek ya da üçüncü BSA molekülünde bulunan benzer grup ile reaksiyon vererek prosesin devam etmesini sağlar. Böylece büyük yapıli agregate olmuş protein molekülleri oluşur (Şekil 2.11).

Agregasyon için önerilen diğer mekanizma ise tiyol oksidasyonudur (Kelly ve Zydney 1994). Tiyol gruplarının oksidasyonu aşağıdaki reaksiyonla tanımlanmaktadır:



R-SH, BSA molekülünün serbest sistein grubunu göstermektedir. Katalitik miktarda demir ve bakır iyonları varlığında çözünmüş oksijen, oksitleyici olarak görev yapmaktadır.



Şekil 2.14. BSA agregasyonunun şematik gösterimi

#### 2.4. Membran Kirliliğine Etki Eden Parametreler

Membran teknolojisinin gelişmeye başladığı ilk yıllarda membran kirliliği önemli bir sorun olarak ortaya çıkmış, ancak son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar ile kirlilik mekanizması aydınlatılmaya başlanmıştır (Cheryan 1998).

Membranda meydana gelen protein kirliliği çeşitli etkileşimleri ve parametreleri içeren kompleks bir olaydır. Proteinin kendi içindeki etkileşimleri, membranla yapmış olduğu etkileşimler, membranın yapısı, çözelti pH ve iyonik gerilimine bağlı olarak değişen membran ve proteinin zeta potansiyeli/yükü membran kirliliğinde rol oynayan önemli parametrelerdir. Literatürde bu konuda yapılmış olan çalışmalarda membran kirliliği ve mekanizması üzerine genel bir görüş geliştirilememiş olması, yapılan deneylerin sınırlı koşullarda geçerli olması ve konunun henüz yeni olmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin, bazı araştırmacılar protein adsorpsiyonunda hidrofobik kuvvetlerin önemli olduğunu savunurken, diğerleri elektrostatik etkileşimlerin hidrofobik etkileşimden daha önemli olduğunu vurgulamaktadır (Yoon vd 1999)

Birçok bileşenden oluşan bir besleme akımının filtrat akısı, işlem sırasında membran ve besleme özelliklerindeki değişimler ve derişim polarizasyonu gibi çeşitli sebeplerden

dolayı saf çözücü akısından düşüktür. Ayırma performansını etkileyen sebeplerden aşağıda kısaca bahsedilmiştir:

*Membran özelliklerindeki değişimler:* Membranın fiziksel veya kimyasal olarak yapısının bozulmasıyla meydana gelir. Membran prosesleri basınç altında yürütüldüğü için, membran deformasyona uğrayabilir. Bunun sonucunda da membranın geçirgenliği değişebilir. Ancak bu değişim MF ve UF membranları içermez, çünkü bu proseslerde basınç 1-7 bar civarlarında, yani düşüktür. Kimyasal bozulma ise pH, sıcaklık ve diğer çevresel faktörlerin membranın çalışma sınırlarının dışına çıkması ile oluşur. Ayrıca sert temizleme malzemeleri ve sık sık temizleme yapılması membranın ömrünü azaltır.

*Besleme özelliklerindeki değişimler:* MF ve UF gibi gözenekli membranlardan çözücü taşınımı, Hagen-Poiseuille eşitliği ile veya kütle aktarım ilişkileri ile geliştirilen vizkoz akış olayları olarak bilinir. Bu nedenle besleme akımının vizkozitesi, yoğunluğu ve difüzyon katsayısının artmasıyla birlikte, tamamen hidrodinamik faktörlerden dolayı akı saf çözücü akısından düşüktür. Bu kolaylıkla tahmin edilebilir ve dikkate alınmalıdır.

*Derişim polarizasyonu:* Kirlilik nedeniyle akıdaki azalma çoğu zaman derişim polarizasyonundan dolayı olan akıdaki azalma ile karıştırılır. Teoride, derişim polarizasyonu etkileri, membran geçiş basıncı ve derişimin azalması, çapraz akış hızı veya türbülansların artması ile tersinirdir. Bu olaylar başarılı olduğu takdirde, akıdaki düşüş polarizasyondan dolayıdır ve gerçek kirlilik sebebiyle değildir.

Membranın kimyasal ve fiziksel yapısı gibi membrana ait bazı özelliklerin kirlilik üzerine etkileri aşağıda açıklanmıştır:

*Hidrofil yapı:* Sulu bir ortamda kirliliğin en az seviyede olması için, membranın hidrofil yapıda olması idealdir. Membran hidrofobik ise hidrofobik veya amfoterik bileşenleri adsorplar. Üretilen birçok membran hidrofobik yapıdadır. Membran hidrofiliğinin ölçüsü yüzeyin ıslanabilirliğinin bir ölçüsü olan temas açısıdır. Bir su damlası yüzeyi tamamen kaplıyorsa temas açısı sıfır veya çok küçüktür. Hidrofobik membranlar ise suyu iter, su ile temasları azdır; bu nedenle temas açıları büyüktür.

*Yüzey topografyası:* Selülozik membranlar yüzey pürüzlülüklerinden dolayı diğer polimerik membranlarla karşılaştırıldığında daha az kirlenirler. CA membran yüzeyleri daha pürüzsüz ve düzgündür. Poliamid kompozit membranlar pürüzlü yapılarından dolayı daha çok kirlenme eğilimindedir.

*Membran yükü:* Birçok membran genel proses şartlarında negatif yüklüdür. Membran yükü, yüklü partiküller ayrılacağı zaman önem kazanır.

*Gözenek boyutu:* Membran gözeneginin boyutu ve partikül boyutu oldukça önemlidir. Büyük gözenekli membranlarda başlangıçta akı daha kopmak yapıdaki membrana göre yüksektir, ancak sonra hızlı bir şekilde düşer. Gözenekler ayrılacak partiküllerin boyutundan daha küçük ise partiküller gözenek içine girmeyecek ve akışın sebep olduğu kesme kuvvetlerinin etkisiyle yüzeyde yığılacaktır.

Membran kirliliği gerçek anlamda çeşitli partiküller ile membran arasındaki spesifik etkileşimlerdir. Membran performansı ile ilişkili olarak besleme akımındaki her bir bileşenin fizikokimyasal karakteristiklerinin anlaşılması önemlidir. Membran kirliliğini etkileyen bazı çözeltili özellikleri aşağıda verilmiştir:

*Proteinler:* Proteinler fonksiyonel gruplarının çokluğu, yük yoğunlukları, farklı derecelerde hidrofoblukları ve kompleks yapıları nedeniyle beslemedeki diğer bileşenler ve ayrıca membran ile spesifik etkileşimlere girmeleri nedeniyle membran prosesleri için en büyük kirlenici grubudur. Kirlilik olayının kompleksliği, yukarıda sayılan

özelliklerin pH, iyonik gerilim, kesme gerilimi, ısıt işlemler ve diğere çevresel faktörlerden etkilenmesi nedeniyledir.

*Tuzlar:* Mineral tuzlar membran kirliliğı üzerine büyük bir etkiye sahiptir. Bir taraftan zayıf çözünlüklerinden dolayı membran yüzeyinde çökelti oluşturabilirler, diğere taraftan da yük etkileşimleri sebebiyle membrana bağlanabilirler.

*pH:* pH'daki değışimler, besleme bileşenlerinin çözünlüğünü ve konformasyonunu değıştirir.

Literatürde yer alan protein-membran etkileşimlerini inceleyen çalışmalar üç grup halinde özetlenebilir:

- i) pH ve iyonik gerilim gibi çözelti özelliklerinin, farklı kimyasal yapı ve gözenek büyüklüğüne sahip membranların elektrokinetik özelliklerine etkisinin incelendiğı çalışmalar,
- ii) pH ve iyonik gerilimin proteinlerin membrana adsorpsiyon özelliklerine etkisinin incelenerek membran kirliliğinde ara yüzey etkileşimlerinin incelendiğı çalışmalar,
- iii) kolloidal teorilere göre ara yüzey etkileşim kuvvetlerinin kantitatif olarak belirlendiğı ve ara yüzey etkileşimlerinde yeni modellerin geliştirilmeye çalışıldığı model çalışmaları

Aşağıda bu grupların her biri için literatürden çeşitli örnekler verilmiştir.

***i) Membranların elektrokinetik özelliklerine çözelti özelliklerinin (iyonik çevre) etkisi:***

Ricq vd (1997) 20 ve 100kDa MWCO polietersülfon (PES) membranlarda bir ve iki değıerlikli tuz çözeltilerinin filtrat akısı ve membran zeta potansiyeli üzerine etkilerini inceleyerek membranların elektrokinetik analizini yapmışlardır. Filtrat akısının en fazla pH, çözelti derişimi ve yapısından etkilendiğini; membranların izoelektrik noktalarının

2.2-2.4 civarında olduğunu ve iki değerlikli iyonların adsorpsiyonu ile zeta potansiyelinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Burns ve Zydney (2000), fitalat, fosfat, borat, asetat ve sitrat gibi biyolojik ortamlarda kullanılan tamponların standart (yüksüz) ve kimyasal olarak modifiye edilen pozitif yüklü 30, 100 ve 300kDa PES ultrafiltrasyon membranların zeta potansiyelleri üzerine spesifik tampon iyonlarının etkileri inceledikleri çalışmalarında, zeta potansiyelinin pH ve iyonik gerilim ile değişimini araştırmışlardır. Pozitif yüklü membranın zeta potansiyelinin tampon türüne bağlı olduğunu, iki ve üç değerlikli anyon adsorpsiyonu ile membranın zeta potansiyelinin azaldığını belirtmişlerdir. Aynı pH ve iyonik gerilim değerlerinde standart ve pozitif yüklü membranların zeta potansiyellerinde -iyonların membran yüzeyine farklı ilgisinden dolayı- büyük farklılıklar gözlemişlerdir. Standart membranın yüzey yükü membran yüzeyinde iyonlaşabilen grupların varlığı ile belirlenirken, pozitif yüklü membran yükü modifikasyon sonucu oluşan spesifik gruplarının iyonlaşma derecesine bağlanmıştır. Ernst vd (2000), PES membranların farklı pH ve derişimlerdeki tek değerlikli tuz çözeltilerinde ( $\text{Na}_2\text{SO}_4\text{-KCl}$ ) zeta potansiyellerini belirlemişler ve sonuçları elektrolitlerin membranda kalma hızıyla (rejection rate) karşılaştırmışlardır.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  derişiminin artması ile elektrolitin membranda kalma hızının bir maksimuma ulaştığı, membran zeta potansiyelinin ise daha yüksek bir derişim değerinde negatif bir maksimum verdiği, zeta potansiyelindeki bu azalmanın elektrolit derişiminin artması ile devam ettiği ve daha sonra zeta potansiyelinin işaretinde değişim olduğu belirtilmiştir.  $\text{SO}_4^{2-}$  anyonlarının seçimli adsorpsiyonunun düşük derişim aralığında membranda kalma hızının artmasına neden olduğu belirtilmiş ve  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  derişiminin artması ile ölçülen zeta potansiyelinin işaretindeki değişimin  $\text{Na}^+$  iyonunun spesifik adsorpsiyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca  $\text{K}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarının membran yüzeyine tercihli adsorpsiyonunun olmadığı, bunun ise membranın elektrostatik özelliklerinin sadece yüzey sülfonik asit gruplarının disosyasyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir. Huisman ve Trägårdh (1999), selüloz asetat ve seramik membranların tuz tutma/retention özelliği ile zeta potansiyeli arasında ilişkiyi veren elektrokinetik akış teorisine dayalı bir model geliştirmişlerdir. Hesaplanan tuz tutma değerleri iyonik gerilimin azalması, yani çift tabaka kalınlığının artması ve zeta potansiyelinin artması ile artmıştır. Türetilen eşitliğin laboratuvar ve endüstriyel uygulamalarda membran zeta potansiyelini tahmininde kolaylıkla kullanılacağına bildirilmesine rağmen; eşitliğin sadece düşük zeta

potansiyeli değerlerinde ve eş hareketliliğe sahip anyon ve katyon içeren elektrolit çözeltelerde geçerli olması kullanımını sınırlamaktadır.

***ii) Proteinlerin membrana adsorpsiyonu ve membran kirliliğinde ara yüzey kuvvetlerinin etkisi:***

Möckel vd (1999), karboksilasyon veya sülfolama tepkimeleri ile modifiye ederek hidrofил özellik kazandırdıkları polisülfon (PS) membranların statik protein adsorpsiyonu, protein geçiş performansı ve membran temizlenebilirliği üzerine etkilerini cys-BSA kullanarak pH=3, 4.8 ve 9 değerlerinde araştırmışlardır. Statik adsorpsiyon, filtrat akısındaki azalma ve protein bağlanma gücünün proteinin izoelektrik noktasında (pH=4.8) maksimum olduğu, bu parametrelerin pH=3'de pH=9'a göre daha düşük değerlerde olduğu belirtilmiştir. Hidrofil özellikteki PS membranın, modifiye edilmemiş PS membrana göre az statik adsorpsiyon özelliği ve filtrat akısında daha az azalma gösterdiği bildirilerek elektrostatik etkileşimlerin yanısıra membranın hidrofил özelliğinin protein kirliliğinde önemli olduğu belirtilmiştir. Burns ve Zydney (1999), miyoglobin, BSA, sitokrom c, pulmozim gibi çeşitli proteinleri kullanarak 30 ve 100 kDa MWCO Biomax<sup>TM</sup> PES UF membranlarda çözelti pH'ının membrandan protein geçişi üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında en fazla protein geçişinin izoelektrik noktada proteini çevreleyen elektriksel çift tabakanın bozulması ile meydana gelen elektrostatik etkileşimler sonucu olduğunu belirtmişlerdir. Akım potansiyeli ölçüm yöntemi ile membranın yük yoğunluğunu ve potansiyometrik titrasyon ile protein yük yoğunluğunu belirleyerek farklı pH değerlerindeki değişimlerini incelemişlerdir. Çözelti pH'ının proteinin membrandan geçiş (sieving) özelliklerinin belirlenmesindeki önemini vurgulamışlardır. Membran ve proteinin farklı yüzey özelliklerine sahip olduğu durumda bile membran yükünün protein ayrılması üzerine önemli etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Aimar vd (1986), karıştırmalı bir hücrede radyoaktif olarak işaretlenmiş BSA'nın IRIS 3038 poliakrilonitril membrana adsorpsiyonunu incelemişler ve adsorpsiyon izotermelerinin Freundlich tipine uyduğunu belirterek BSA'nın izoelektrik noktasında adsorpsiyonun minimum olduğunu belirlemişlerdir. Adsorplanan protein miktarının yığın deşişiminin ve temas süresinin artması ve pH'ın azalması ile arttığını

gözlemişler; membran direncini protein derişimi ve temas süresinin fonksiyonu olarak ifade etmişlerdir. Adsorplanan protein miktarı ve dirençteki değişimin membran materyaline bağlı olduğu, ancak adsorplanan proteinin hepsinin hidrolik direnç üzerine aynı etkiye sahip olmadığı belirtilerek mekanizmanın karmaşık olduğu ve matematiksel açıklamasının güç olduğu bildirilmiştir. Matthiason (1983), BSA'nın farklı MWCO değerindeki selüloz asetat (CA), PS ve poliamid (PA) membranlara adsorpsiyonunu incelemiş; ve çözelti ve membran yüzey özelliklerinin adsorplanan miktar, adsorplanan tabaka direnci ve adsorpsiyon kinetiği üzerine etkilerini araştırmıştır. Adsorpsiyonun pH'a güçlü bir biçimde bağlı olduğunu ve izoelektrik noktanın üzerindeki pH değerinde itme kuvvetlerinden dolayı adsorpsiyonun az olduğunu, proteinin izoelektrik noktasında itme kuvvetlerinin azalması nedeniyle adsorpsiyonun arttığını ve izoelektrik noktanın altında çekme kuvvetlerinin etkin olduğunu, protein adsorpsiyonunun daha da arttığını bildirmiştir. Ayrıca CA membranların, PA ve PS membranlardan daha az protein adsorpladığını bildirilmiştir. Xu vd (2003), BSA'nın gözenekli polietilen membranlara adsorpsiyonunda pH, derişim, karıştırma hızı gibi çeşitli parametrelerin etkisini incelemişler ve protein moleköl boyutunun en küçük değeri almasından dolayı maksimum adsorpsiyonun proteinin izoelektrik noktasında meydana geldiğini bildirmişlerdir. Belfer vd (2000), protein adsorpsiyonu sonucu membran yüzeyinde meydana gelen değişimleri incelemek için modifiye, modifiye edilmemiş ve proteinle kirlenmiş PES membranların FTIR-ATR spektroskopisi kullanarak yüzey karakterizasyonunu incelemişlerdir. PES membranın modifikasyonu sonucu yüzeyde yeni yapısal ve fonksiyonel gruplar yaratılmış ve protein adsorpsiyonunda özellikle alifatik bölgede yaratılan grupların önemli olduğu belirtilmiştir

***iii) Ara yüzey etkileşim kuvvetlerinin kantitatif olarak belirlenmesi ve ara yüzey etkileşimlerinde yeni modellerin geliştirilmesi:***

Zydney ve Pujar (1998) yüklü membran gözenekleri ve yüklü protein arasındaki etkileşim serbest enerjisini dikkate alarak membran yükünün protein taşınımı üzerine etkilerini teorik olarak ifade eden elektrostatik, van der Waals ve sterik etkileşimlere dayanan bir model geliştirmişlerdir. Uzun mesafeli kolloidal etkileşimlerin gözenekli

membranlardan protein taşınım hızı üzerine önemli etkileri olduğunu vurgulamışlardır. Burns ve Zydney (2001) termodinamik (partisyon) ve hidrodinamik (sürtünme) etkileşimlerin her ikisini de dikkate alarak bir model geliştirmişlerdir. Yüklü PES membrandan ovotransferrin taşınımında farklı koşullarda yapılan deney sonuçları ile geliştirdikleri model sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Modelin membrandan protein taşınımı üzerine pH ve iyonik gerilimin kompleks etkisini yansıttığını bildirmişlerdir. Huisman vd (2000), BSA çözeltisinin 30, 100 ve 300 kDa PS membranlar ile ultrafiltrasyonu sırasında protein-protein ve protein-membran etkileşimlerini inceledikleri çalışmalarında, farklı pH değerlerinde filtrat akısı ve akım potansiyeli ölçümleri yaparak proteinin membrandan geçiş derecesini belirlemişlerdir. UF'un başlangıç basamağında protein-membran etkileşimlerinin kirlilik üzerine etkili olduğunu, daha sonraki basamakta ise protein-protein etkileşimlerinin tüm performansı etkilediğini öne sürmüşlerdir. Kirli membranların AFM ile alınan görüntülerinde tüm membran yüzeyinin protein ile kaplandığı gözlenmiştir. Kirli tabaka oluşumunun pH'a bağlı olduğu ve izoelektrik noktanın altındaki düşük pH değerlerinde protein geçişinin fazla olduğu belirtilmiştir. Menon ve Zydney (2001), membran sistemlerinde elektrostatik etkileşimlerin önemini vurguladıkları çalışmalarında, 30 ve 50kDa MWCO PES membranlar ile miyoglobin ve bovin karbonik anhidraz proteinleri kullanmışlar; proteinlerdeki lizin gruplarının asetik anhidrit ile bloke edilmesiyle oluşturulan kimyasal türevlerinin derişimini ve net protein yükünü kapiler elektroforez ile belirlemişler. Elektroforez ile belirledikleri filtrat ve yığın protein derişimlerini oranlayarak her protein için elek katsayısı (sieving coefficient) belirlemişlerdir. İyonik gerilimi düşük olan çözeltilerde daha fazla negatif yüke sahip olan iyonların elektrostatik itme özelliklerinde artış olduğunu belirtmişlerdir.

Membran kirliliğine yönelik yukarıda özetlenen elektrokinetik çalışmaların bir kısmında tuz/tampon çözeltilerindeki anyon veya katyonların farklı pH ve iyonik gerilimlerde çeşitli membran türlerine adsorpsiyonu çalışılarak membranın çözeltilerdeki zeta potansiyeli/yüzey yükünün belirlenmesine ve membran ile iyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimlerin açıklanmasına çalışılmıştır. Protein çözeltisi ile yapılan elektrokinetik çalışmalarda ise izoelektrik nokta ve civarında çalışılarak farklı

tamponlarda pH ve iyonik gerilimin proteinin membrandan geçiş özellikleri, membrana adsorpsiyonu, membran yükü ve filtrat akısı üzerine etkileri incelenmiştir. Ayrıca, son zamanlarda özellikle akışlı membran sistemlerinde ara yüzey etkileşimlerinin membran kirliliği üzerine etkisini teorik olarak ifade edebilmek için model çalışmaları yapılmıştır.

Tüm bu çalışmalara rağmen, membranda meydana gelen kirliliğin mekanizmasının açık olarak ortaya konulamamış ve genelde kabul gören ifadelerin henüz türetilmemiş olması dikkat çekmektedir.

Membran kirliliği membran ve proteinlerin fizikokimyasal yapısından kuvvetli bir şekilde etkilenir. Yüzey kimyası ve protein-membran etkileşimleri kirlilik olaylarının anlaşılması için anahtardır. Bu spesifik etkileşimler, adsorbe olmuş proteinler ve sıvı yığındaki diğer proteinler arasında da olabilir. Bu nedenle kirlilik hakkında genel kurallar veya teoriler oluşturmak güç olacaktır. Sıvı yığındaki her bileşen, membran ile farklı etkileşimler verecektir. Bunun nedeni her bileşenin konformasyonu ve zeta potansiyelinin iyonik çevre ile değişmesi sonucunda protein-membran ve protein-protein etkileşimlerindeki ara yüzey kuvvetlerinin değişimidir.

### 3. MEMBRANDA ETKİN DİFÜZYON KATSAYISININ BELİRLENMESİ

#### 3.1. Kaynak Araştırması

Protein/enzim üretim proseslerinde, proteinlerin difüzyon katsayılarının bilinmesi biyoreaktör etkinliğinin tahmini ve ayırma işlemlerinin optimizasyonu için gereklidir. İleri bir teknolojik ayırma işlemi olan ve proteinlerin ayrılması/saflaştırılmasında sıkça kullanılan membran sistemlerinde de, temel tasarım parametrelerinden biri olarak proteinlerin membran içindeki difüzyon katsayılarının belirlenmesi önem taşımaktadır. Ancak kompleks yapılarından dolayı proteinlerin difüzyon katsayılarının belirlenmesi ile ilgili araştırmalar sınırlıdır; özellikle pH, iyonik gerilim gibi ara yüzey ve kolloidal etkileşimleri etkileyen faktörlerin difüzyon katsayısına etkisini inceleyen, membran kirliliğinin kantitatif analizini yapan çalışmalar literatürde yer almamaktadır. Çeşitli organik bileşiklerin membran sistemlerinde difüzyon katsayılarının belirlenmesi ile ilgili, literatürdeki sınırlı sayıdaki çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Clark ve Lucas (1998), içme suyu üretiminde kirliliğe neden olan humik asidin 30 kDa PS membranda taşınımını tek boyutlu difüzyon ve lineer partitasyon ile modellemişlerdir. pH ve kalsiyum iyon derişiminin fonksiyonu olarak humik asit ve membran arasında etkileşim gücünü ifade etmek üzere bir etkileşim parametresi tanımlamışlardır. Adsorplanan humik asit kütlesi ve hesaplanan etkileşim parametresinin, pH'ın azalması ve kalsiyum iyon derişiminin artması ile arttığını belirlemişlerdir. Adsorpsiyon deney verilerinden yararlanarak buldukları hümik asit difüzyon katsayısının pH'ın azalması ve kalsiyum iyon derişiminin artması ile arttığını bildirmişlerdir. Wang vd (2001), hümik asidin polikarbonat membranlardaki difüzyon katsayısını bir difüzyon hücresi kullanarak belirlemişler ve sonuçları Clark ve Lukas (1998)'ın model sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Humik asit difüzyon katsayısının pH azalması ve kalsiyum iyon derişiminin artması ile arttığını gözleyerek sonuçların Clark

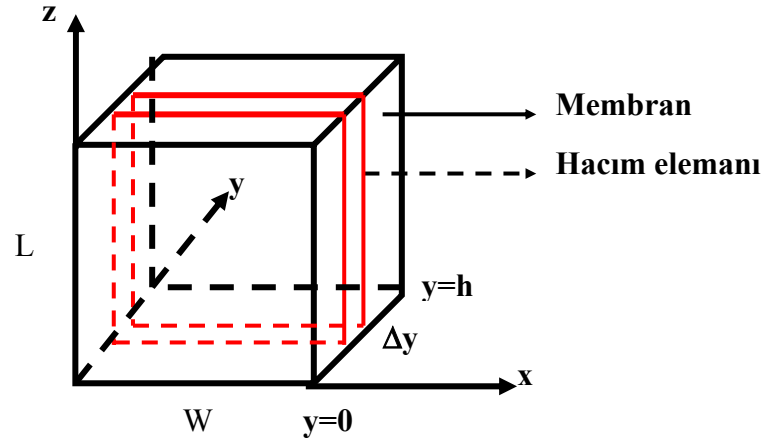
ve Lukas (1998)'in model sonuçları uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Masselin vd (2000), bir difüzyon hücresinde farklı MWCO değerlerinde PES ve akrilik membranlar ile üre, formamid gibi nötral çözeltiler ve HCl, KCl gibi kuvvetli elektrolitler kullanarak membranların yapısal bir parametresi olan gözeneklilik:kalınlık oranlarını belirlemek için difüzyon deneyleri yapmışlar; sterik etkilerin ve partiküllerin membrana adsorpsiyonunun ihmal edilebildiği koşullarda, çalışılan bileşenlerin bu oranın belirlenmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Groß ve Heintz (2000), fenol, anilin, 2-klorofenol, 4-nitrofenol gibi aromatik bileşenlerin polieter-poliamid blok kopolimer membrandaki difüzyon katsayılarını bileşenlerin çözünürlüğüne bağlı olarak, membrana bileşenlerin adsorpsiyonunun olduğu ve olmadığı iki ayrı durum için geliştirdikleri modellerden belirlemişlerdir. Membranda birikim olduğu durumda bulunan difüzyon katsayılarının model sonuçları ile uyumlu olduğunu gözlemişlerdir. Farklı sıcaklıkta yapılan difüzyon deneyleri sonucunda difüzyon aktivasyon enerjilerini hesaplamışlardır. Difüzyon katsayısının molekül boyutunun artması ile azaldığını, sıcaklığın artması ile de arttığını bildirmişlerdir. Shao ve Baltus (2000), dekstran ve polietilen glikolün (PEG) polikarbonat membralarda etkin difüzyon katsayısını partikül-partikül etkileşimlerini de dikkate alarak incelemişlerdir. Geliştirdikleri modelde, denge dağılım katsayısı ve gözenek içi difüzyon katsayısını derişime bağlı olarak ifade etmişlerdir. Dekstranın etkin difüzyon katsayısının derişimin artması ile arttığını, PEG'in etkin difüzyon katsayısının ise derişimin artması ile azaldığını bildirerek, bu durumun PEG'in agregasyona uğramasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir

Bu doktora çalışmasında, protein-membran etkileşimlerinin bir göstergesi olarak seçilen etkin difüzyon katsayısının, sistemi tanımlamak üzere kurulan bir modelin çözümüyle belirlenmesi ve protein/enzim, membran ve çözeltiler özellikleri ile derişiminin bulunması amaçlanmıştır.

### 3.2. Model ve Çözüm Yöntemi

Membranda protein/enzimin etkin difüzyon katsayısının ( $D_e$ ) belirlenebilmesi için, membran içinde alınan bir hacim elemanında aşağıda belirtilen varsayımlar yapılarak kütle korunum denklemi kurulmuş ve denklemin çözümü için başlangıç ve sınır koşulları belirlenmiştir.

**Hacim elemanı:** Kartezyen koordinat sisteminde gözenekli membran içinde uzunluğu  $L$ , genişliği  $W$  ve kalınlığı  $\Delta y$  olan hacim elemanı seçilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Membran içinde seçilen hacim elemanının gösterimi

**Varsayım 1:** Protein, membran yüzeyine ve gözeneklerine adsorplanmaktadır.

Birim zamanda proteinin hacim elemanına konumunda moleküler taşınımla giriş hızı	-	Birim zamanda proteinin hacim elemanından konumunda moleküler taşınımla çıkış hızı	=	Birim zamanda proteinin hacim elemanında yığın fazda birikim hızı	+	Birim zamanda proteinin hacim elemanına adsorpsiyon hızı
--	---	--	---	---	---	--

$$N_y \varepsilon L W \Big|_y - N_y \varepsilon L W \Big|_{y+\Delta y} = \varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} L W \Delta y + (1 - \varepsilon) \frac{\partial q}{\partial t} L W \Delta y \quad (3.1)$$

Eş.3.1,  $LW\Delta y$  çarpımı ile bölünüp,  $\Delta y \rightarrow 0$  için limiti alınarak düzenlenirse Eş.3.2 elde edilir.

$$-\frac{\partial(N_y \varepsilon)}{\partial y} = \varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} + (1 - \varepsilon) \frac{\partial q}{\partial t} \quad (3.2)$$

Burada:  $N_y$ ; moleküler aktarım akısı,  $\varepsilon$ ; membran gözenekliliği,  $q$ ; membran yüzeyine/gözeneklerine adsorplanan madde miktarı;  $C$ ; membran gözeneklerinde biriken çözelti protein derişimidir. Moleküler aktarım akısı Fick Yasasına göre Eş. 3.3'deki gibi tanımlanır:

$$N_y = -D_y \frac{\partial C}{\partial y} \quad (3.3)$$

Eş.3.3, Eş.3.2'de yerine konularak Eş.3.4 elde edilir.

$$-\frac{\partial \left( -\varepsilon D_y \frac{\partial C}{\partial y} \right)}{\partial y} = \varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} + (1 - \varepsilon) \frac{\partial q}{\partial t} \quad (3.4)$$

Aşağıdaki varsayımlar dikkate alınarak yeniden düzenlemeler yapılırsa Eş.3.5 elde edilir:

**Varsayım 2:** Sabit sıcaklık

**Varsayım 3:** Lineer adsorpsiyon kinetiği ( $q=KC$ )

**Varsayım4:** Etkin difüzyon katsayısı ( $D_y=D_e$ ) derişimin fonksiyonu değildir (Seyreltik çözeltiler için geçerli)

**Varsayım 5:** Membran gözenekliliği sabit ( $\varepsilon=\text{sabit}$ )

$$D_e \varepsilon \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} = [\varepsilon + K(1 - \varepsilon)] \frac{\partial C}{\partial t} \quad (3.5)$$

Etkin difüzyon katsayısının bulunması için bir deney sistemi tasarlanarak (Bölüm 4.2.3.) denklemin çözümüne yönelik veriler türetilmiştir. Eş.3.5'in düzenlenmesiyle elde edilen Eş.3.6'nın çözümü için başlangıç ve sınır koşulları aşağıda verilmiştir.

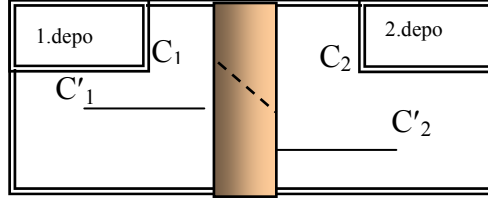
$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D_e \varepsilon}{[\varepsilon + K(1 - \varepsilon)]} \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \quad (3.6)$$

$$\begin{aligned} \text{Başlangıç Koşulu} : \quad t = 0 \quad C = 0 \\ \text{Sınır Koşulu} \quad : \quad y = 0 \quad C = C(t) = C_1 \\ \quad \quad \quad \quad \quad y = h \quad C = C(t) = C_2 \end{aligned}$$

Eş.3.6'nın değişkenlere ayırma yöntemi ile yapılan genel çözümü, Eş.3.7 ile verilmiştir (Crank 1956). Çözüm yöntemi EK 1'de yer almaktadır.

$$C(t, y) = C_1 + (C_2 - C_1) \frac{y}{h} + \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{C_2 \cos(n\pi) - C_1 \sin\left(\frac{n\pi y}{h}\right)}{n} \exp\left(-\frac{\frac{D_e \varepsilon}{\varepsilon + K(1 - \varepsilon)} n^2 \pi^2 t}{h^2}\right) \quad (3.7)$$

Eş.3.7'de yer alan  $C_1$  ve  $C_2$ , membranın  $y=0$  ve  $y=h$  sınırlarındaki derişim değerlerini,  $K$  adsorpsiyon denge sabitini ve  $h$  membran kalınlığını göstermektedir. Bölüm 4.2.3'de verilen deney sisteminde sıvı yığınınındaki protein derişiminin ( $C_2'$ ) zamanla değişimi ölçülmektedir. Eş.3.7'de membran yüzeyindeki derişim değerlerinden ( $C_1$  ve  $C_2$ ) sıvı yığını protein derişim değerlerine ( $C_1'$  ve  $C_2'$ ) geçilebilmesi için membran ve sıvı yığını arasındaki dağılıma katsayısına/denge değerine ihtiyaç vardır. Bu değer, *Varsayım 3*'de belirtilen  $K$  adsorpsiyon denge değeri olarak alınmış, dolayısıyla  $D_e$ 'nin pH ve iyonik gerilim ile değişimi modele bu şekilde yansıtılmıştır. Difüzyon hücresi içindeki protein derişim profili şematik olarak Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Difüzyon hücresi içindeki derişim profili

Eş.3.6'nın genel çözümünden (Eş.3.7) yararlanarak kuramsal olarak 2 nolu depoda derişimin ( $C_2'$ ) zamanla değişimi bulunabilir. Bunun için de derişimin zamanla değişimini veren eşitliklere ihtiyaç vardır. Eş.3.7'nin  $y=h$  değerinde türevi alınır (Eş.3.8) ve 2 nolu depoda kütle korunum denklemi kurularak (Eş.3.9), Eş.3.8 ile Eş.3.9 birleştirilirse 2 nolu depoda derişimin zamanla değişimi elde edilir (Eş.3.10). Eş.3.10'da soldaki derişim değeri sıvı faz, sağdaki derişim değeri ise membran yüzeyine ait derişim değerleridir. Membran yüzeyindeki protein derişimleri ( $C_1$  ve  $C_2$ ) yerine denge değerinden yararlanarak yığın faz protein derişimleri ( $C_1'$  ve  $C_2'$ ) yazılıp düzenlenirse Eş.3.11 elde edilir (Groß ve Heintz 2000).

$$\left(\frac{\partial C}{\partial y}\right)_{y=h} = \frac{1}{h}(C_2 - C_1) + \frac{2}{h} \sum_{n=1}^{\infty} (C_2 - C_1 \cos(n\pi)) \exp\left(-\frac{D_e \varepsilon}{\varepsilon + K(1 - \varepsilon)} \frac{n^2 \pi^2 t}{h^2}\right) \quad (3.8)$$

$$-D_e \left(\frac{\partial C}{\partial y}\right)_{y=h} = \frac{V_2}{A} \frac{dC_2}{dt} \quad (3.9)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = -\frac{AD_e}{V_2} \left[ \frac{1}{h}(C_2 - C_1) + \frac{2}{h} \sum_{n=1}^{\infty} (C_2 - C_1 \cos(n\pi)) \exp\left(-\frac{D_e \varepsilon}{\varepsilon + K(1 - \varepsilon)} \frac{n^2 \pi^2 t}{h^2}\right) \right] \quad (3.10)$$

$$\frac{dC'_2}{dt} = \frac{AD_e K}{V_2 h} \left[ (C'_1 - C'_2) + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (C'_1 \cos(n\pi) - C'_2) \exp \left( -\frac{\frac{D_e \varepsilon}{\varepsilon + K(1-\varepsilon)} n^2 \pi^2 t}{h^2} \right) \right] \quad (3.11)$$

Eşitlik 3.11'de 1 nolu depodaki sıvı faz protein derişimi  $C'_1$  bilinmemektedir, teorik olarak  $C'_1$ ' nün belirlenmesi amacıyla 1 ve 2 nolu depolar arasında protein için kütle korunum dengesi kurulur (Eş.3.12).

$$\left| \begin{array}{c} \text{Başlangıçtaki} \\ \text{protein miktarı} \end{array} \right| = \left| \begin{array}{c} \text{1 nolu depodaki} \\ \text{protein miktarı} \end{array} \right| + \left| \begin{array}{c} \text{2 nolu depodaki} \\ \text{protein miktarı} \end{array} \right| + \left| \begin{array}{c} \text{Membranda} \\ \text{biriken protein} \\ \text{miktarı} \end{array} \right|$$

$$C'_0 V_1 = C'_1 V_1 + C'_2 V_2 + \left( \frac{Ah}{2} \right) K (C'_1 + C'_2) \left[ 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left( -\frac{\frac{D_e \varepsilon}{\varepsilon + K(1-\varepsilon)} (2n+1)^2 \pi^2 t}{h^2} \right) \right] \quad (3.12)$$

Eş.3.12'de sağdaki üçüncü terim Eş.3.7'nin integrasyonu ile bulunan membranda biriken madde miktarını vermektedir (Crank 1956, Clark ve Lucas 1998). Eş.3.12 düzenlenerek 1 nolu depodaki sıvı yığınındaki protein derişimi  $C'_1$  elde edilir (Eş.3.13):

$$C'_1 = \frac{C'_0 V_1 - C'_2 \left( V_2 + \frac{KAh}{2} \left[ 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left( -\frac{\frac{D_e \varepsilon}{\varepsilon + K(1-\varepsilon)} (2n+1)^2 \pi^2 t}{h^2} \right) \right] \right)}{V_1 + \frac{KAh}{2} \left[ 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left( -\frac{\frac{D_e \varepsilon}{\varepsilon + K(1-\varepsilon)} (2n+1)^2 \pi^2 t}{h^2} \right) \right]} \quad (3.13)$$

Eşt.3.13, Eşt.3.11'de yerine konularak proteinin difüzlendiği depoda derişimin ( $C_2'$ ) zamanla değişim profili elde edilir.  $D_e$  ayarlanabilir parametre olmak üzere deneysel ve kuramsal verilerin uyumuna göre -ayar parametresi-  $D_e$  seğimi yapılır. Bu basamaktan sonra denklemin çözümlü Matlab ortamında yazılan bir program ile yapılmıştır.

## 4. MATERYAL ve YÖNTEM

### 4.1. Materyal

#### 4.1.1. Bovin serum albümin (BSA)

Çalışmada model protein olarak kullanılan bovin serum albumin (BSA, Sigma A9647) toplam 582 amino asit ve 9253 atomdan oluşmaktadır. Yapısında 2930 C, 4610 H, 780 N, 894 O ve 39 S atomu bulundurmaktadır. Çizelge 4.1’de BSA’nın amino asit bileşimi yer almaktadır. Molekül ağırlığı 67 kDa, izoelektrik noktası  $pI = 4.7-4.9$ ’dur (Jones vd 2000). Sulu çözeltideki etkin yarıçapı 3nm’dir (Bowen 1998).

Çizelge 4.1. BSA’nın amino asit bileşimi (<http://www.biochem.usyd.edu.au>)

Amino asit	Sayı	Amino asit	Sayı	Amino asit	Sayı	Amino asit	Sayı
Alanin	47	Sistein	35	İzolözin	14	Prolin	28
Arjinin	23	Glutamik asit	59	Lizin	59	Treonin	33
Asparajin	14	Glisin	16	Metiyonin	4	Triptofan	2
Aspartik asit	39	Histidin	17	Fenilalanin	27	Trozin	20
Glutamin	20	Lözin	61	Serin	28	Valin	36

#### 4.1.2. Serin alkali proteaz (SAP)

Çalışmada model enzim olarak kullanılan serin alkali proteaz (SAP, Sigma P-5380) toplam 275 amino asit içermektedir (Çizelge 4.2). Molekül ağırlığı  $MA=27.5$  kDa, izoelektrik noktası  $pI=9$ ’dur. Enzim-membran etkileşimlerine çözeltide bulunan iyonların etkisinin incelendiği çalışmalarda, SAP’ın fermentasyon ortamındaki bileşenler dikkate alınmıştır. SAP’ın Çizelge 4.3’de *Bacillus licheniformis*’den

fermentasyon ile üretim ortamı bileşimi verilmiştir. Çalışmada sentetik ortam ile gerçek fermentasyon ortam verilerini karşılaştırmak amacıyla kullanılan SAP enzimi, ODTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü Biyokimyasal Reaksiyon Mühendisliği ve Endüstriyel Biyoteknoloji Grubu'ndan sağlanmıştır.

Çizelge 4.2. SAP'ın amino asit bileşimi (<http://www.brenda.uni-koeln.de>)

Amino asit	Sayı	Amino asit	Sayı	Amino asit	Sayı	Amino asit	Sayı
Alanin	40	Sistein	0	İzolözin	10	Prolin	10
Arjinin	4	Glutamik asit	5	Lizin	9	Treonin	20
Asparajin	18	Glisin	35	Metiyonin)	5	Triptofan	1
Aspartikasit	9	Histidin	5	Fenilalanin	4	Trozin	13
Glutamin	20	Lözin	16	Serin	32	Valin	31

Çizelge 4.3. SAP'ın r-Bacillus licheniformis'den üretimi için fermentasyon ortam bileşimi (Çalık vd 2003)

Bileşen	C, kg/m <sup>3</sup>
Glukoz	8.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.63
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.055
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.71
CaCl <sub>2</sub>	0.20

#### 4.1.3. PES ve CTA membranlar

Çalışmada 10 ve 100 kDa molekül ağırlığı tutma değerlerinde (MWCO) ve farklı kimyasal yapılarda PES (Sartorius 1463925N, Biomax PBGC02510, PBHK02510) ve CTA (Sartorius 1453925N) membranlar kullanılmıştır. Bölüm 2.2.1 ve 2.2.2'de membranların kimyasal yapıları ve fiziksel özellikleri ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Çizelge 4.4'de ise ayırma işlemlerinde dikkat edilen temel bazı özellikleri verilmiştir.

Çizelge 4.4. Membranların özellikleri

Membran	MWCO, kDa	pH aralığı	Kimyasal yapı	D, mm
PES	10, 100	1-14	<i>Hidrofob</i>	25
CTA	10	4-8	<i>Hidrofil</i>	25

## 4.2 Deneysel Yöntem

### 4.2.1. Protein-membran etkileşimleri: Statik adsorpsiyon deneyleri

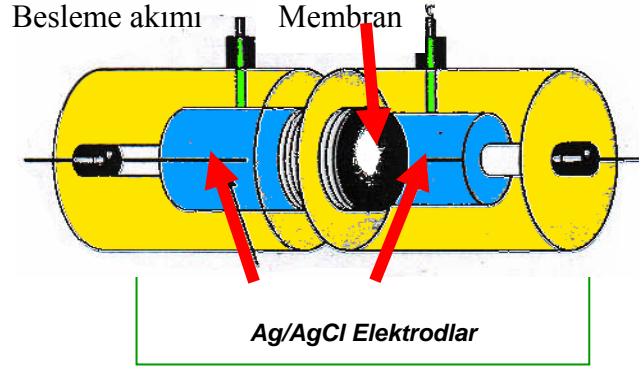
BSA'nın 10 kDa PES ve CTA membran ile 100 kDa PES membranlara 30°C sabit sıcaklıkta 200 dk<sup>-1</sup> karıştırma hızında orbital karıştırıcı (Gallenkamp) kullanılarak, 150 ml hacimli kesikli sistemlerde adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. İyonik gerilimi sağlamak için 0.01 M ve 0.1 M KCl çözeltileri kullanılmış ve 0.1-2.8 g/L derişim aralığında protein çözeltileri stok çözeltiden seyreltilerek hazırlanmıştır. Çözeltilerin pH'ı 10 mM HCl ve 10 mM KOH kullanılarak istenen değerlere ayarlanmıştır. Proteinin izoelektrik noktasında (pH=4.78), izoelektrik noktasının üstünde (pH=6.80) ve altında (pH=3.78) adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiş -CTA membranların çalışma pH aralığı uygun olmadığı için izoelektrik noktanın altına inilmemiştir- ve 15 dakika aralıklarla sıvı fazdaki protein derişimleri izlenerek çözeltideki protein miktarındaki azalmanın sabit bir seviyeye ulaşması-*dengeye ulaşılması*- ile deneyler bitirilmiştir. Membrana adsoplanan protein miktarı kütle korunum dengesi ile bulunmuştur. Örnek bir hesaplama EK 2'de verilmiştir. Bu işlem sonunda çözeltideki proteinin denge derişimine (C\*, g/L) karşı birim membran kütlesi başına adsorplanan protein miktarı (q, mg<sub>protein</sub>/g<sub>membran</sub>) grafiğe geçirilerek adsorpsiyon izotermi oluşturulmuştur. Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler deiyonize su (Waters, MilliQ) ile hazırlanmıştır. Membranlar adsorpsiyon işleminden önce bir gece deiyonize su içinde bekletilerek üretimden gelen safsızlıklar uzaklaştırılmıştır.

SAP enziminin 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyon deneyleri ise, 30°C sabit sıcaklıkta, 200 dk<sup>-1</sup> karıştırma hızında orbital karıştırıcı (Gallenkamp) kullanılarak 150 ml hacimli kesikli sistemlerde gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin pH değerleri enzimin fermentasyon ortamında kullanılan fosfat tamponları ile ayarlanmış ve 0.25-1 g/L derişim aralığında proteaz çözeltileri stok çözeltiden seyreltilerek hazırlanmıştır. Adsorpsiyon deneyleri proteazın izoelektrik noktasında (pH=9.08), izoelektrik noktasının üstünde (pH=11.06) ve altında (pH=7.14) gerçekleştirilmiş ve 10 dakika aralıklarla sıvı fazdaki proteaz derişimleri izlenerek çözeltideki enzim miktarındaki azalmanın sabit bir seviyeye ulaşması *-dengeye gelmesi-* ile deneyler bitirilmiştir. Membrana adsorplanan enzim miktarı ve adsorpsiyon izotermlerinin oluşturulması BSA için yapılan hesaplamalar temel alınarak yapılmıştır.

#### 4.2.2. Membran zeta potansiyellerinin belirlenmesi

Membran zeta potansiyellerinin/yüzey yükünün belirlenmesi için akım potansiyeli ölçüm yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, durgun katı yüzey (membran) ile temasta olan elektrolit hareketi temeldir. Ölçüm yönteminin temel prensibi Bölüm 2.4.1.1'de açıklanmıştır. Şekil 4.1'de akım potansiyeli ölçümü için tasarlanarak imal ettirilen sistem görülmektedir. Sistemde 2.5 cm çapında ve 2.5 cm uzunluğunda silindirik iki depo bulunmaktadır. Membran, iki depo arasına sızdırmazlığı sağlayacak şekilde monte edilmiştir. Membranda oluşan potansiyel farkını ölçmek için kullanılan Ag/AgCl referans elektrodların yapımında 1 mm çapında gümüş tel (Sigma) kullanılmıştır. Gümüş tel, bir indirgeme elektrodu içeren 1M KCl içine konulmuş ve 10 mA'lik akıma maruz bırakılarak tel yüzeyinde Ag/AgCl tabakanın uniform olarak birikmesi (anodik birikme) sağlanmıştır. Elektrodların uçları uygun soketler kullanılarak pH/mV (Pye-Unicam) metreye bağlanmıştır. Sisteme peristaltik pompa ile elektrolit beslemesi yapılmıştır. Giriş akımına bir basınç göstergesi yerleştirilmiştir. Farklı basınçlarda akım potansiyelleri belirlenerek Helmholtz-Smoluchowski eşitliği (Eş. 2.4) ile membran zeta potansiyelleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar için gerekli olan çözelti iletkenlikleri

Sartorius PP-50 iyon metre ile ölçülmüştür. Ölçümler yapılmadan önce sistemin kararlı hale gelmesi beklenmiştir.

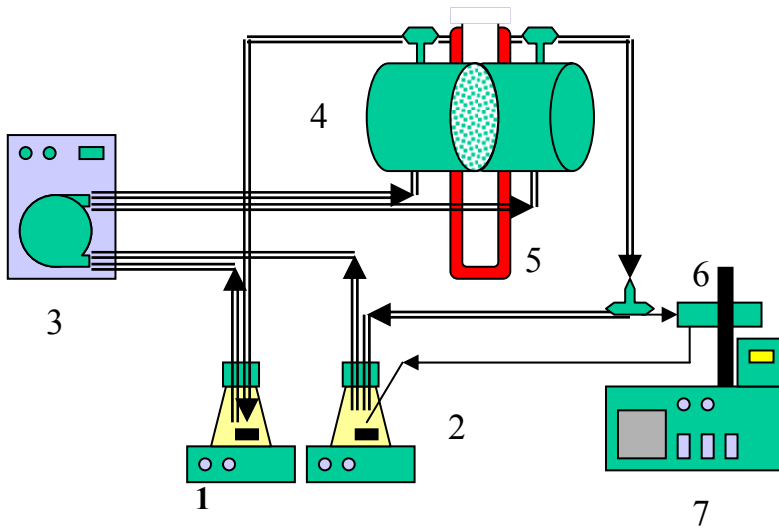


Şekil 4.1. Akım potansiyeli ölçümü deney sistemi

#### 4.2.3. Etkin difüzyon katsayısı bulunması

Proteinlerin UF membranlarda etkin difüzyon katsayısının bulunması için tasarlanarak imal ettirilen deney sistemi Şekil 4.2'de şematik olarak gösterilmiştir. Teflon malzemedен yaptırılan sistem eşit hacimli ( $8 \text{ cm}^3$ ) silindirik iki depoya sahiptir. Membran, bu depoların arasına sızdırmazlık sağlayacak şekilde yerleştirilmiştir. Soldaki depoda protein, sağdaki depoda ise tuz/tampon çözeltisi yüksek bir hızda pompa yardımıyla sirküle ettirilerek difüzyon hücresi için iki depoda da tam karışma sağlanmıştır. Yüksek hızda sirkülasyonun, aynı zamanda derişim polarizasyonu etkilerini azaltması da amaçlanmıştır. Ayrıca 1 ve 2 nolu çözelti tankları manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılarak alınan örneklerin homojen olması sağlanmıştır. Depolar için yapılan tam karışma varsayımının doğruluğu bir indikatör izleyici yardımıyla sağlanmıştır. Bu varsayım ile, sıvı yığın faz ile membran yüzeyindeki protein derişimlerinin eşit olduğu kabul edilmiş ve yığın çözeltiliden zamanla alınan örneklerin derişimi, modelden elde edilen (Eş.3.13) derişim-zaman verilerinin karşılaştırılmasında kullanılmıştır. Model ve deney sonuçlarının uyumuna göre farklı

koşullar için (pH ve iyonik gerilim) proteinlerin etkin difüzyon katsayısı belirlenmiştir. Membrandan geçerek tuz çözeltisinin olduğu 2 nolu depoya difüzlenen proteinlerin 15 dakikalık zaman dilimlerinde sekiz saat süresince on-line olarak  $\lambda=280$  nm dalga boyunda bir filtrenin takılı olduğu bir akış hücresine sahip UV/VIS absorban dedektörden (UA 6 UV/VIS ISCO) mV ölçümleri yapılmış ve protein derişimleri EK 3'de verilen (mV; protein derişimi) kalibrasyonları kullanılarak hesaplanmıştır. Membranın iki yüzü arasındaki basınç farkı elimine edilerek konveksiyon ile kütle aktarımının ihmal edildiği koşullar sağlanmıştır. Bu varsayımın doğruluğu ise, her iki deponun çıkış hatları arasında T-bağlantısı yardımıyla bağlanan bir U-manometrede basınç farkının gözlenmemesi ile kanıtlanmıştır. Bu şekilde membrandan protein aktarımı, sadece difüzyon mekanizması ile gerçekleşmiştir.



Şekil 4.2. Etkin difüzyon katsayısının bulunması için deney sistemi  
1. Protein çözelti tankı, 2. Tuz çözelti tankı, 3. Peristaltik pompa, 4. Difüzyon hücresi, 5. U-manometre, 6. Akış hücresi, 7. Kaydedici

### 4.3. Analitik Yöntemler

#### 4.3.1. Protein analizi

BSA derişimi  $\lambda=277$  nm dalga boyunda (Nakamura vd 1998, Norde 2000), SAP derişimi ise  $\lambda=275$  nm dalga boyunda spektroskopik olarak (UV 160-A Shimadzu) belirlenmiştir. Dalga boyu belirlenmesi için protein çözeltilerinin  $\lambda=200-600$  nm aralığında dalga boyu taraması yapılarak spektrumları alınmış ve maksimum absorbans veren dalga boyları seçilmiştir. Farklı derişimler ve pH değerlerinde farklı tuz çözeltileri içinde hazırlanan protein çözeltilerinin absorbansları okunarak derişim-absorbans kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş (EK 4) ve her deneyden önce kalibrasyonlar yinelenmiştir.

Fermentasyonla üretilen SAP'ın derişimi Lowry yöntemine göre ölçülmüştür (Lowry vd 1951). Bu yöntemde 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 100  $\text{cm}^3$  0.1 N NaOH içinde çözümlenerek A çözeltisi; 0.05g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 10 $\text{cm}^3$  0.1 g sodyum potasyumtartarat içinde çözümlenerek B çözeltisi hazırlanır. 100 $\text{cm}^3$  A çözeltisi ile 2  $\text{cm}^3$  B çözeltisi karıştırılarak buzdolabında bir gün bekletilir. Bu çözelti 0.45  $\mu\text{m}$  çaplı selüloz asetat filtreden süzülür. Çözeltinin 5  $\text{cm}^3$ 'ü ile 1  $\text{cm}^3$  enzim çözeltisi karıştırılır ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilir. Bu karışımın üzerine ise 0.5  $\text{cm}^3$  Folin Fenol Reagent eklenerek yine oda sıcaklığında 50 dk tepkimeye sokulur. Bu süre sonunda örneğin UV spektrofotometrede  $\lambda= 750$  nm dalga boyunda absorbansı okunur. Örneklerdeki toplam protein derişimini belirlemek için bovin serum albüminin (BSA) derişimi bilinen örneklerinden yararlanılarak derişim-absorbans kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (EK 5).

### **4.3.2. FTIR-ATR ölçümleri**

Kullanılmamış ve proteinle kirlenmiş PES ve CTA membranların yüzey yapısında meydana gelen değişimlerin belirlenmesinde FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer 040520 ve MIDAC) kullanılmıştır. Kurutulmuş membranların, ZnSe kristali kullanılarak kristal ve örnek arasındaki ışın yansımaları sonucunda, ışının örnek içinde ilerlerken verdiği absorpsiyon bantlarındaki azalmanın izlenmesi temeline dayalı FTIR-ATR spektrumları alınmıştır. Yatay ATR ünitesi 45° açılı altı adet aynaya sahiptir.

### **4.3.3. SEM ve AFM analizleri**

Membran yüzey ve gözeneklerinde adsorpsiyondan sonra meydana gelen değişimlerin - gözenek çapı ve adsorplanan tabaka kalınlığı- belirlenmesi için SEM ve AFM gibi mikroskobik yöntemlerden yararlanılmıştır. Üretimden gelen safsızlıkları Milli-Q suda bekletilerek uzaklaştırılan temiz membranlar ile adsorpsiyon deneylerinden sonra kirlenmiş olan membranlar oda sıcaklığında kurutularak SEM analizi için hazırlanmıştır. SEM analizleri Türkiye Çimento Müstahsilleri Birliği (Leo 435 VP) ve Türkiye Petrolleri Anonim Ortaklığı'nda (Jeol JSM-840A) yaptırılmıştır. AFM (Atomic Force Microscopy) analizleri ise Nanoscope III-A (Digital Instrument, Inc., Santa Barbara, CA, USA) cihazında (tapping mode) Sabancı Üniversitesi'nde yaptırılmıştır.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. BSA'nın 10 kDa PES Membranlara Adsorpsiyonu

BSA'nın (MA=67 kDa) 10kDa MWCO PES membranlara statik adsorpsiyon deneyleri, izoelektrik noktasının üzerinde, izoelektrik noktasında ve izoelektrik noktasının altındaki pH değerlerinde (sırasıyla 3.78, 4.78=pI ve 6.80), 0.01 M ve 0.1 M derişimlerinde KCl çözeltileri ile sağlanan iyonik gerilimde gerçekleştirilmiştir.

BSA'nın 0.01 M iyonik gerilim ve üç pH değerinde 10 kDa PES membranlara adsorpsiyonunda başlangıç derişimleri  $C_0=0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0$  ve  $2.6$  g/L olan protein çözeltileri kullanılmış; sıvı fazdan alınan örneklerde zamanla protein derişiminin değişimi izlenmiş ve yaklaşık bir saat sonunda denge değerlerine ulaşıldığı gözlenmiştir (Şekil 5.1-5.3). Membran yüzeyine adsorplanan protein miktarları, başlangıç derişiminin artması ile artmıştır. BSA'nın 0.1 M iyonik gerilim ve pH=6.80 ve 4.78 değerinde 10 kDa PES membranlara adsorpsiyonunda ise başlangıç derişimleri  $C_0=0.5, 1.0, 1.5, 2.0$  ve  $2.5$  g/L olan protein çözeltileri kullanılarak sıvı fazdan alınan örneklerde zamanla protein derişiminin değişimi izlenmiştir (Şekil 5.4-5.5). Başlangıç protein derişiminin artması ile membran yüzeyine adsorplanan protein miktarı da artmıştır.

Dengede, membrana adsorplanan protein miktarlarının sıvı faz derişimlerine karşı grafiğe geçirilmesi ile çalışılan her koşul için adsorpsiyon denge izotermi oluşturulmuştur. Farklı pH ve iyonik gerilim değerlerinde BSA'nın PES membranlara adsorpsiyon izotermlerinin Freundlich izotermine uyduğu belirlenmiş (Şekil 5.6) ve adsorpsiyon denge izoterm denklemleri Çizelge 5.1'de verilmiştir.

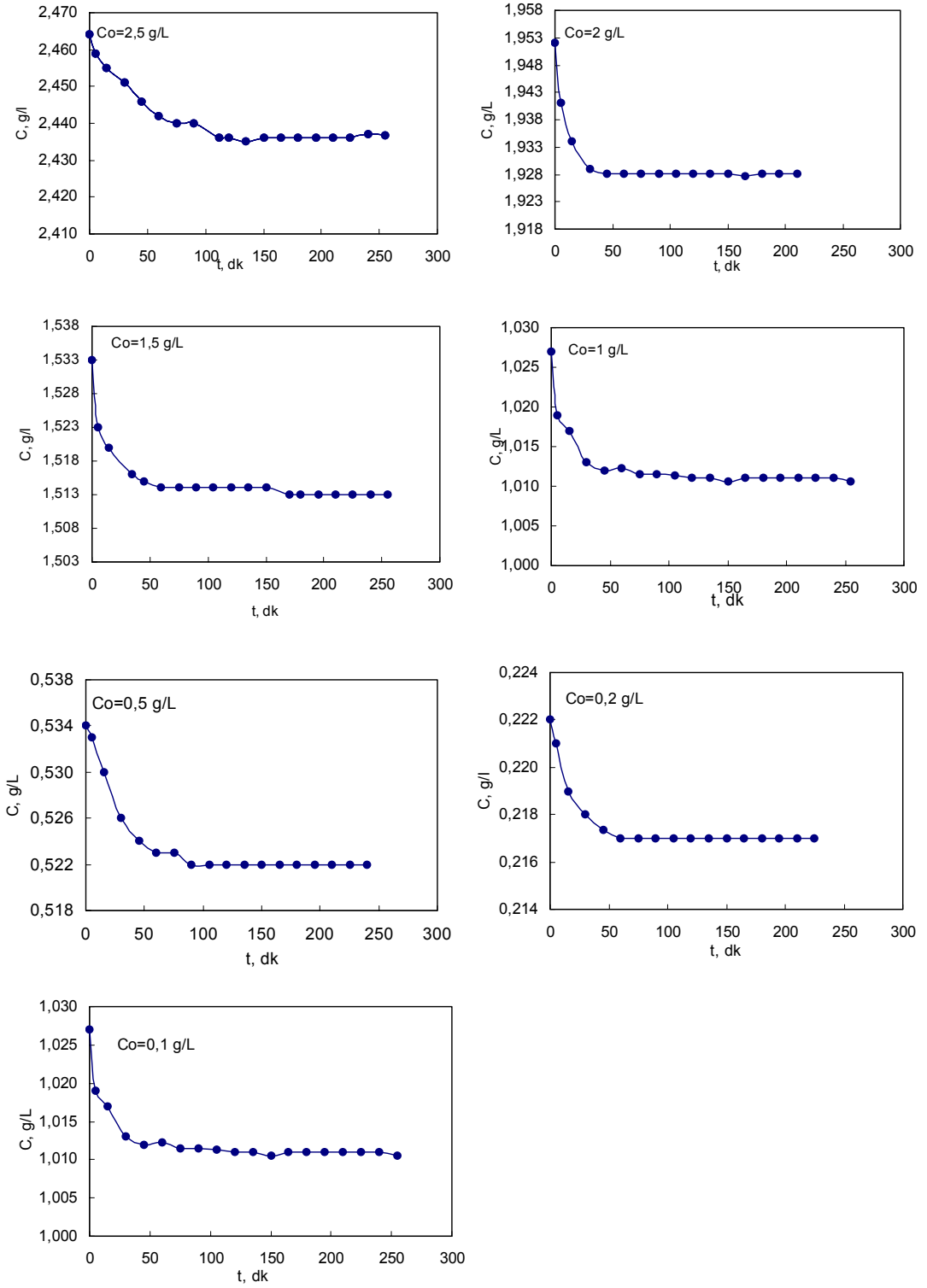
Adsorplanan protein miktarı izoelektrik noktada (pH=4.78) izoelektrik noktanın altında (pH=3.78) ve üzerindeki (pH=6.80) pH değerlerine göre daha az olmuş; en fazla adsorpsiyon ise izoelektrik noktanın altında meydana gelmiştir. İyonik gerilimin artması ile çalışılan tüm pH değerlerinde adsorplanan protein miktarı azalmıştır (Şekil 5.6).

Adsorpsiyon deneyleri esnasında proteinin cama adsorpsiyonunun olup olmadığını araştırmak için pH=6.80, 0.01M KCl ve Co=2.47 g/L başlangıç BSA derişiminde bir kontrol deneyi gerçekleştirilmiş ve protein derişiminin zamanla değişimi incelenmiştir (Şekil 5.7). Protein derişiminde zamanla bir azalma gözlenmediği için proteinin cama adsorplanmadığı, sadece membrana adsorplandığı varsayılmıştır.

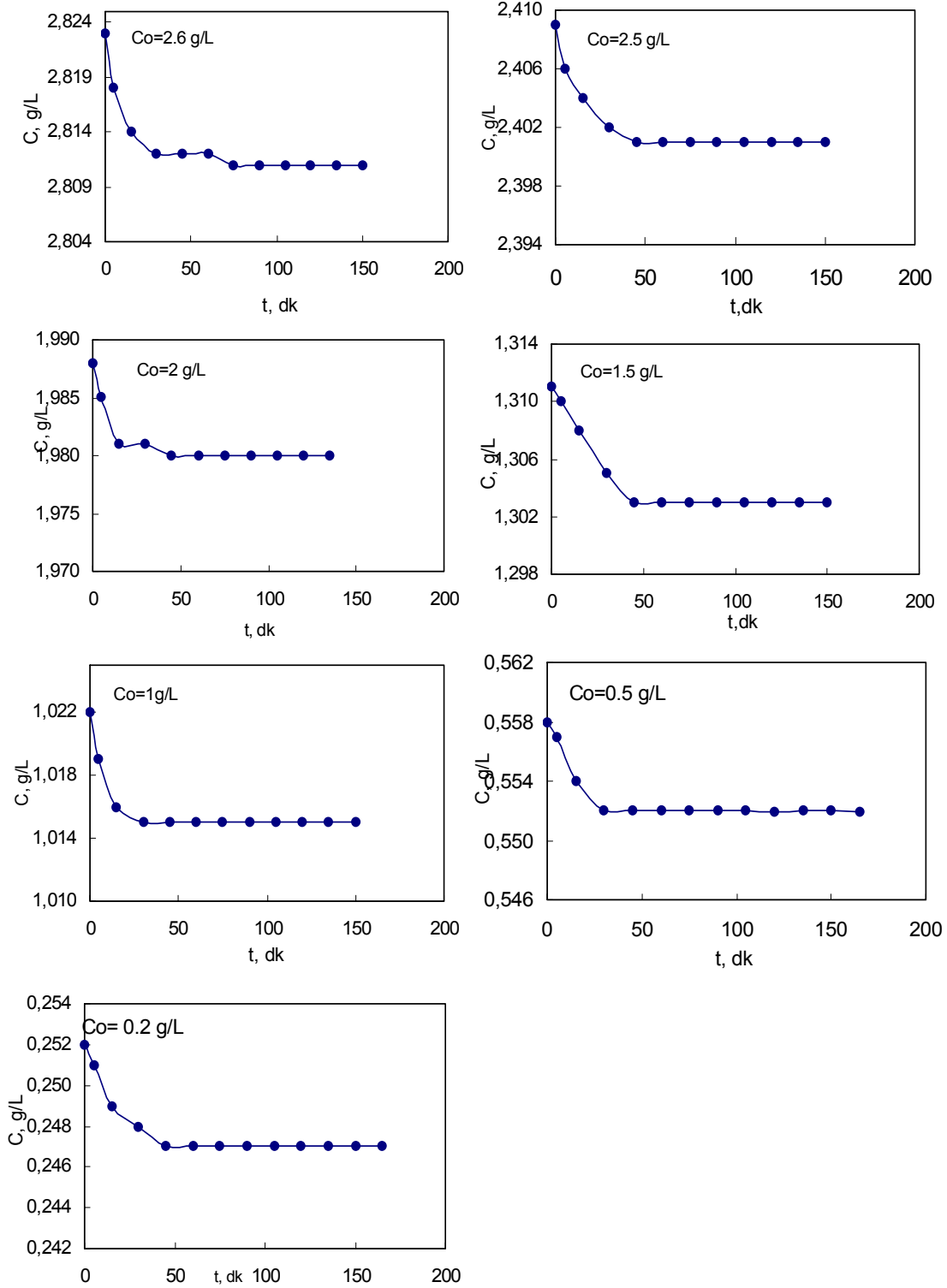
## 5.2. BSA'nın 10 kDa CTA Membranlara Adsorpsiyonu

BSA'nın (MA 67 kDa) 10 kDa CTA membranlara adsorpsiyonu, proteinin izoelektrik noktasının üzerinde ve izoelektrik noktasındaki pH değerlerinde (sırasıyla 4.78=pI ve 6.80) ve KCl çözeltileri ile sağlanan 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilimlerde incelenmiştir. Membranın çalışma pH aralığı (pH=4-8) uygun olmadığı için proteinin izoelektrik noktasının altında (pH=3.78) adsorpsiyon deneyleri yapılmamıştır. Co=0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 2.8 g/L başlangıç protein derişimlerinde yapılan adsorpsiyon deneylerinde, sıvı fazdaki protein derişimlerinin zamanla değişimi izlenmiş (Şekil 5.8-5.11) ve dengede membrana adsorplanan protein miktarının sıvı faz denge derişimlerine karşı grafiğe geçirilmesi ile adsorpsiyon denge izotermi oluşturulmuştur (Şekil 5.12). Freundlich izotermine uyduğu belirlenen denge izoterm denklemleri Çizelge 5.2'de verilmiştir.

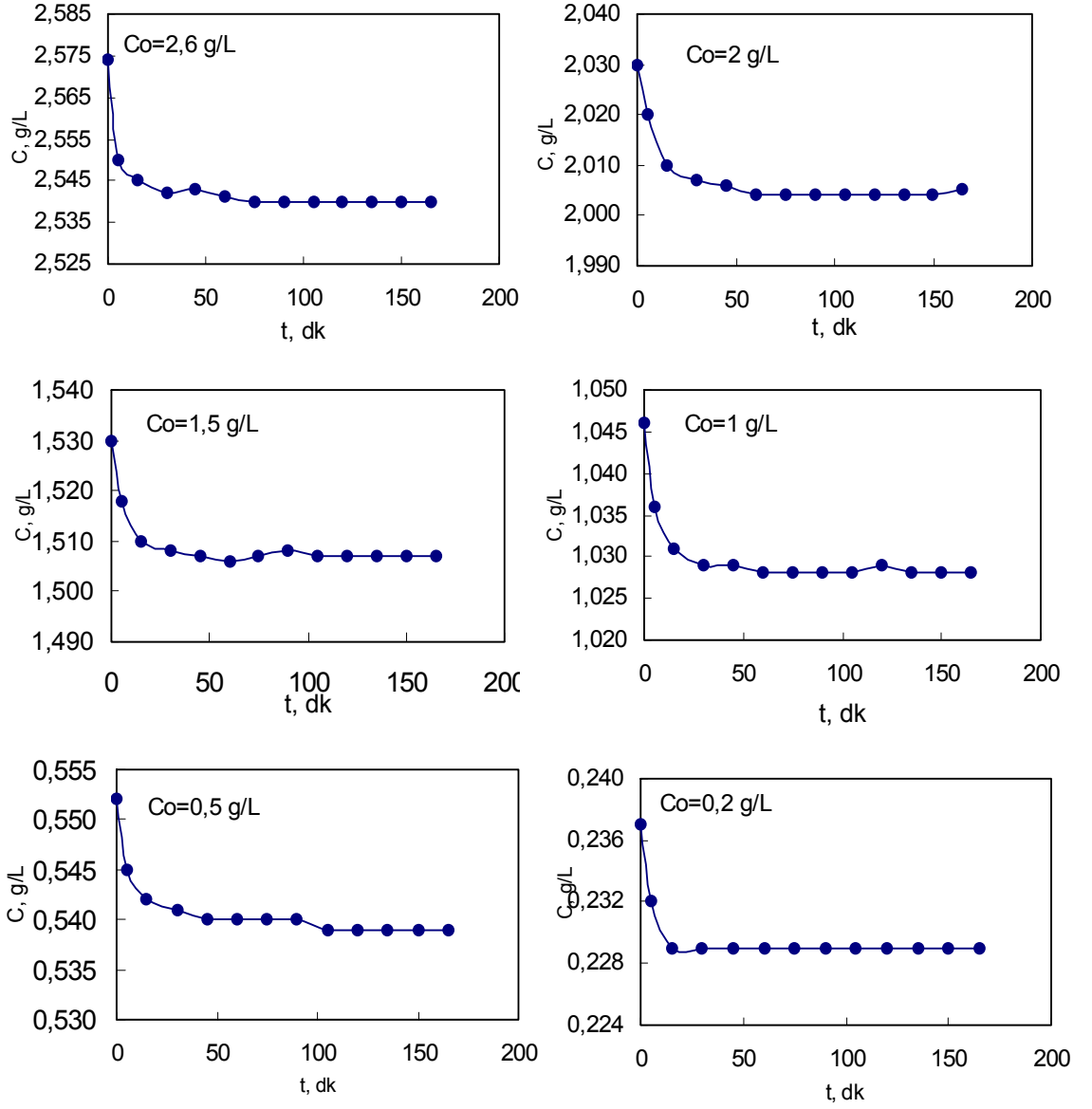
Adsorpsiyon deneylerinde kullanılan  $N=200 \text{ dk}^{-1}$  karıştırma hızının kütle aktarım kısıtlamalarını ortadan kaldırmak için yerli olup olmadığının kontrolü daha yüksek bir karıştırma hızı ( $N=300 \text{ dk}^{-1}$ ) denenerek incelenmiştir. Şekil 5.13'de Co=1 g/L başlangıç protein derişiminde ve iyonik çevre koşullarının aynı (pH=6.80 ve 0.01 M iyonik gerilim), ancak karıştırma hızlarının farklı olduğu ortamlarda zamanla membrana adsorplanan protein miktarının değişimi yer almaktadır. Her iki karıştırma hızında da adsorplanan protein miktarları aynıdır.



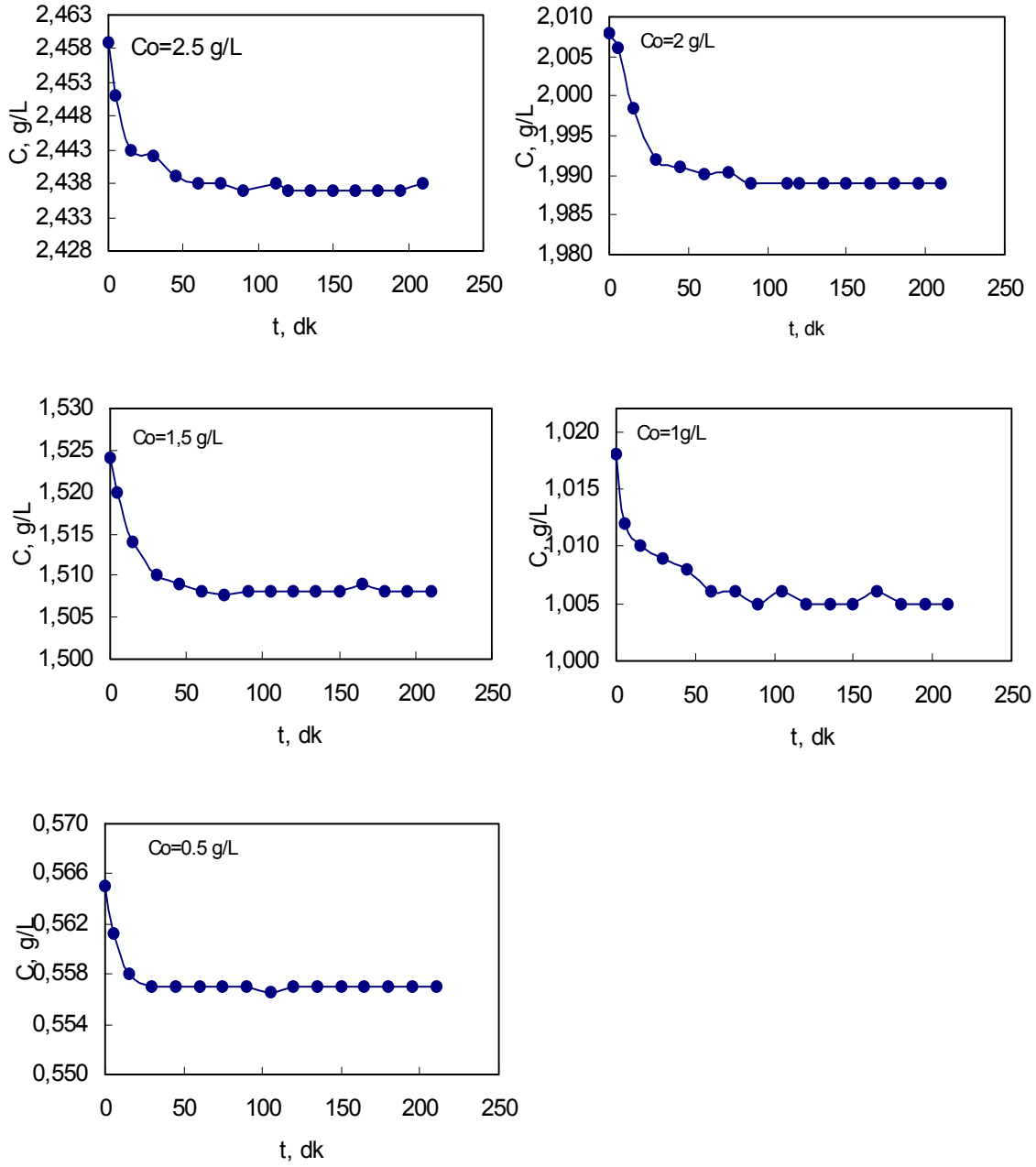
Şekil 5.1. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değışimi



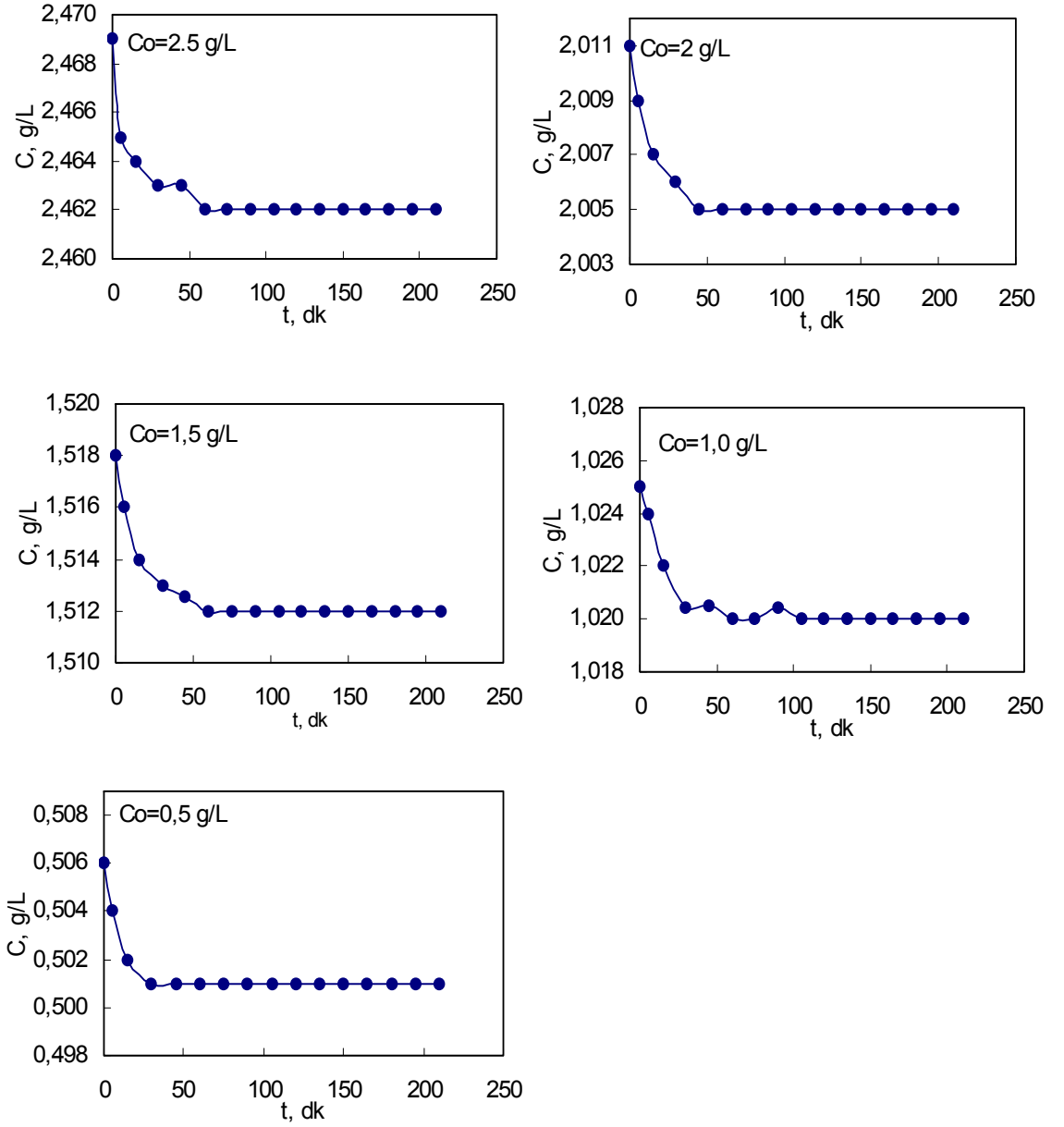
Şekil 5.2. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değışimi



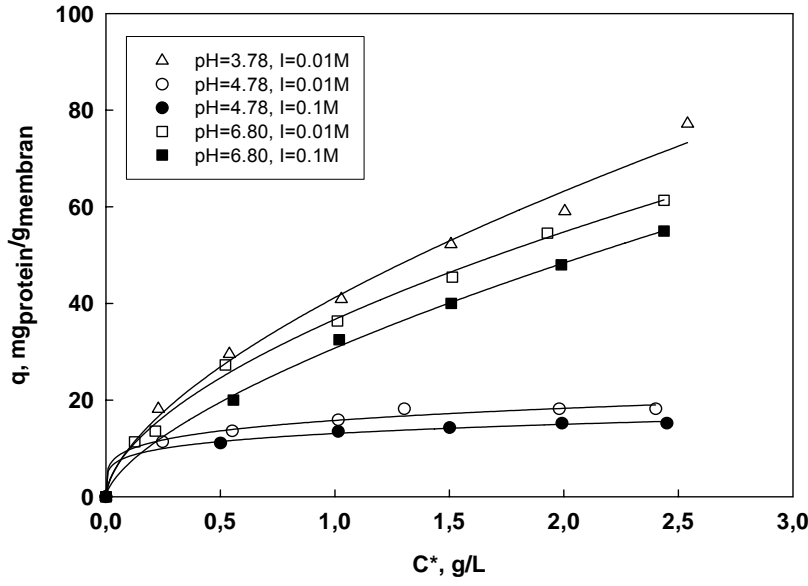
Şekil 5.3. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=3.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



Şekil 5.4. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



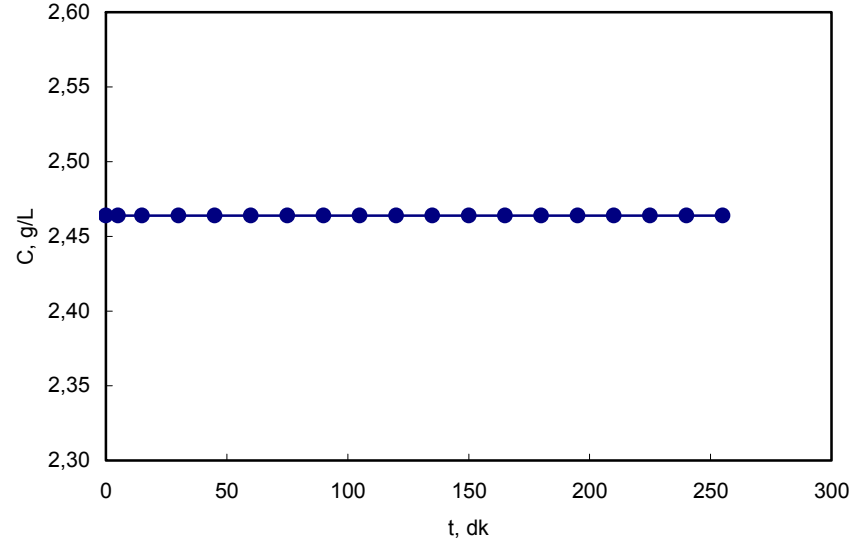
Şekil 5.5. BSA'nın 10 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



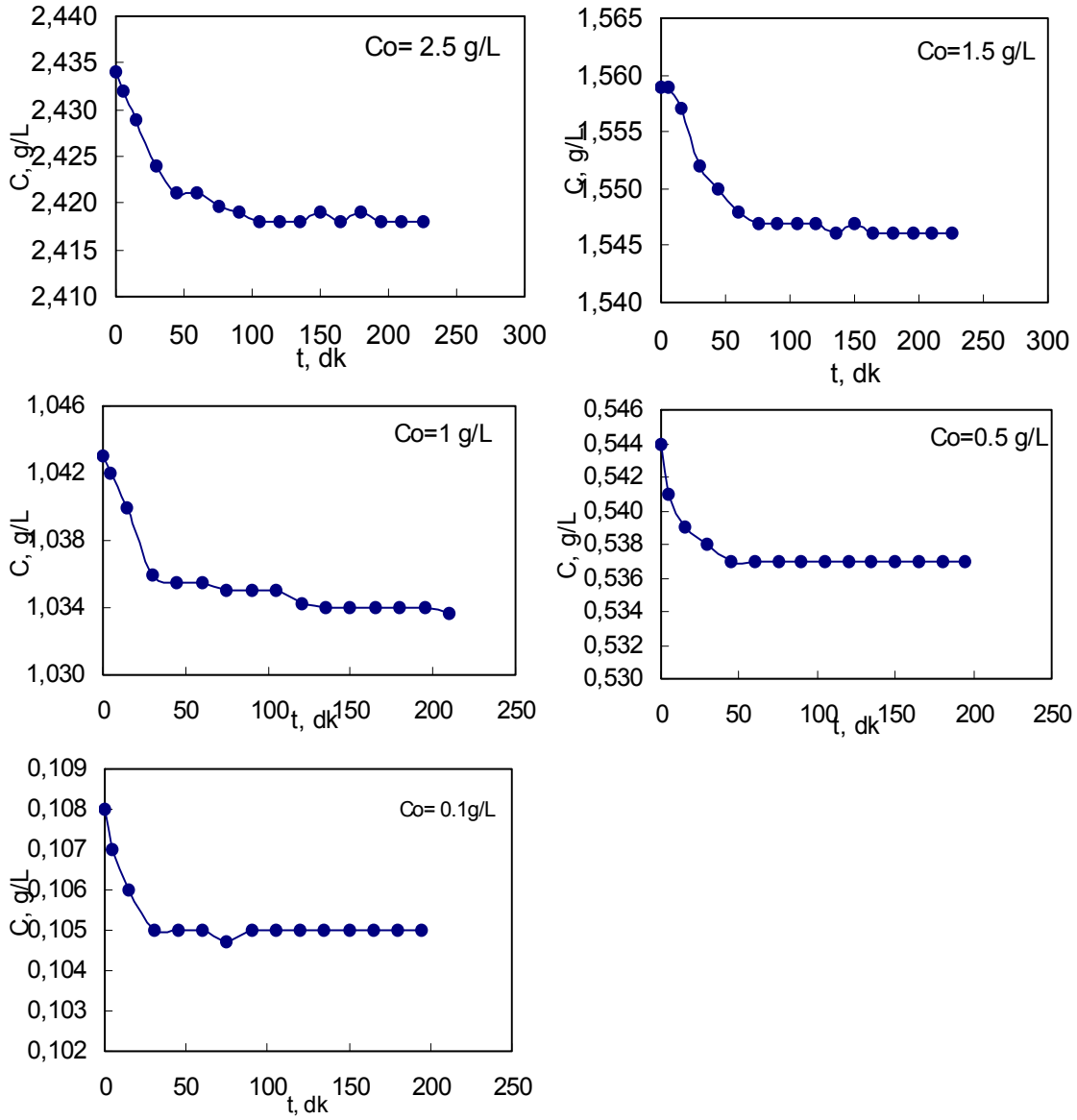
Şekil 5.6. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın 10 kDa PES membranlara adsorpsiyon denge izotermi

Çizelge 5.1. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın PES membranlara adsorpsiyon izoterm denklemleri

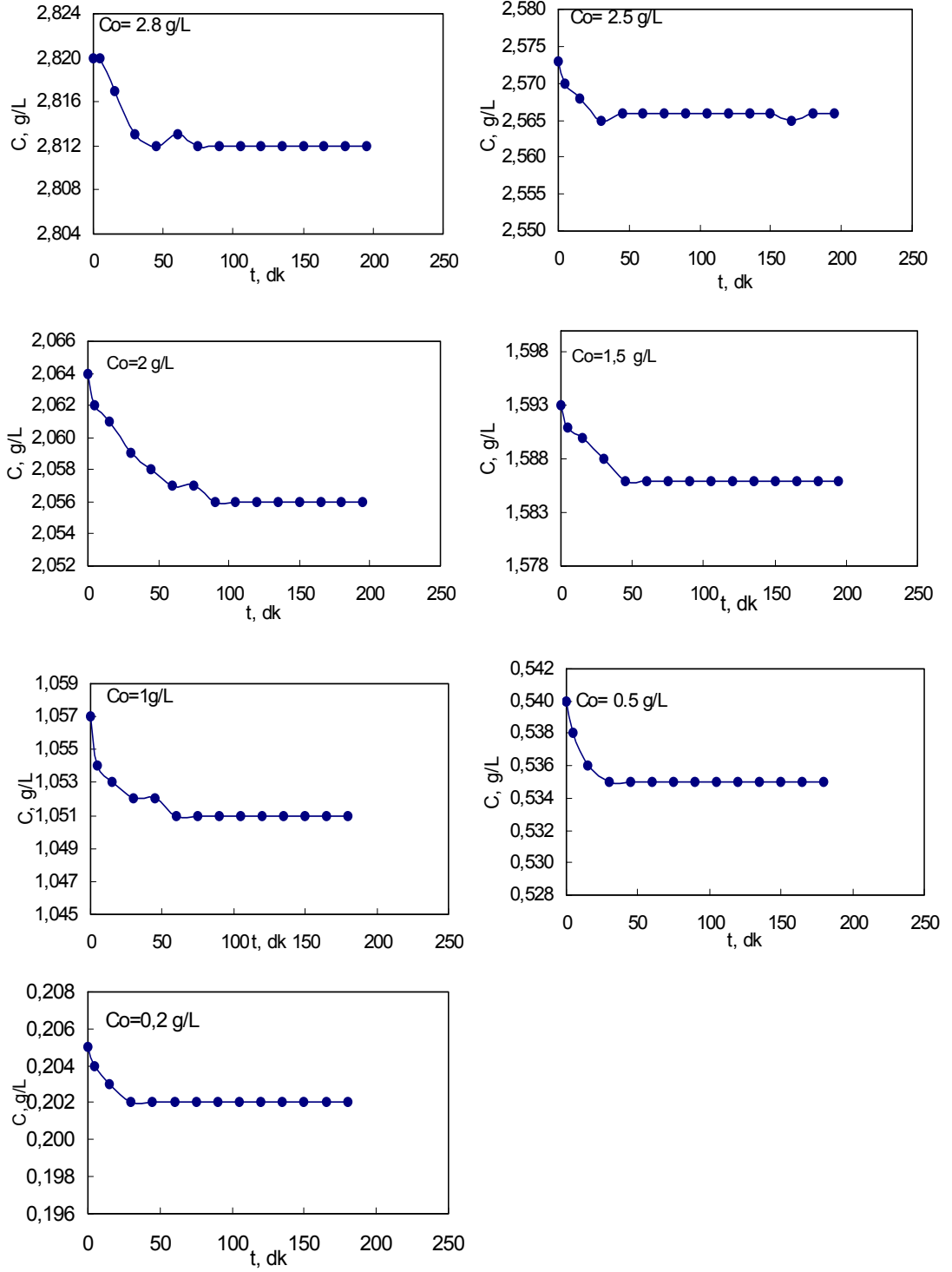
pH	Adsorpsiyon izotermi				
	0.01M KCl		0.1M KCl		
3.78	$q=41.21(C^*)^{0.62}$	$R^2=0.99$	-	-	-
PES 4.78	$q=15.84(C^*)^{0.26}$	$R^2=0.98$	$q=13.09(C^*)^{0.19}$	$R^2=0.99$	$R^2=0.99$
6.80	$q=36.74(C^*)^{0.58}$	$R^2=0.99$	$q=30.76(C^*)^{0.65}$	$R^2=0.99$	$R^2=0.99$



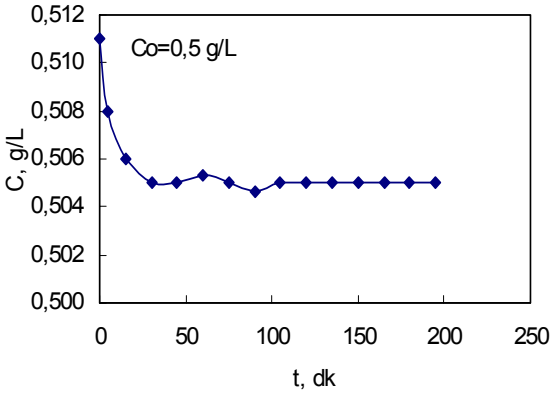
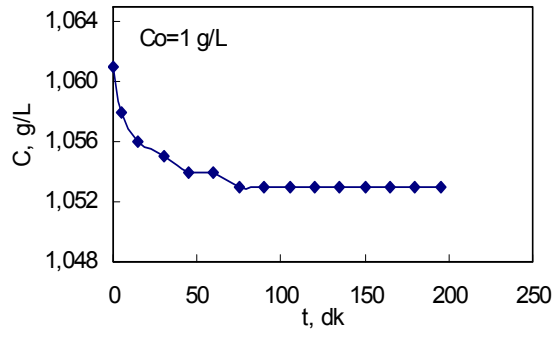
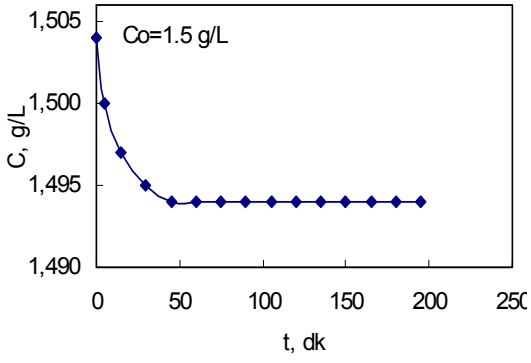
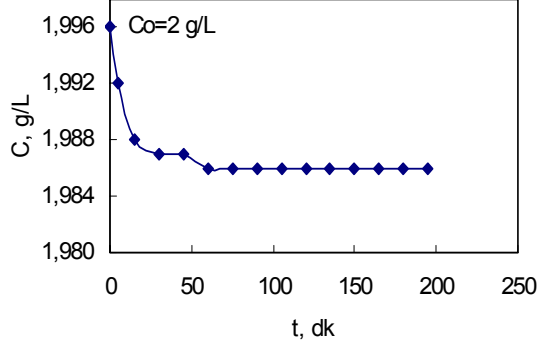
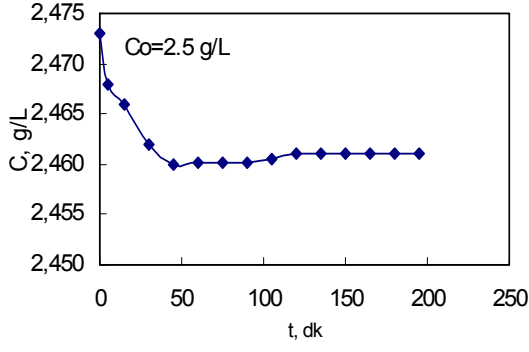
Şekil 5.7.  $C_0=2.47$  g/L, pH= 6.80 ve 0.01M KCl koşullarında BSA'nın cama adsorpsiyonu kontrol deneyi



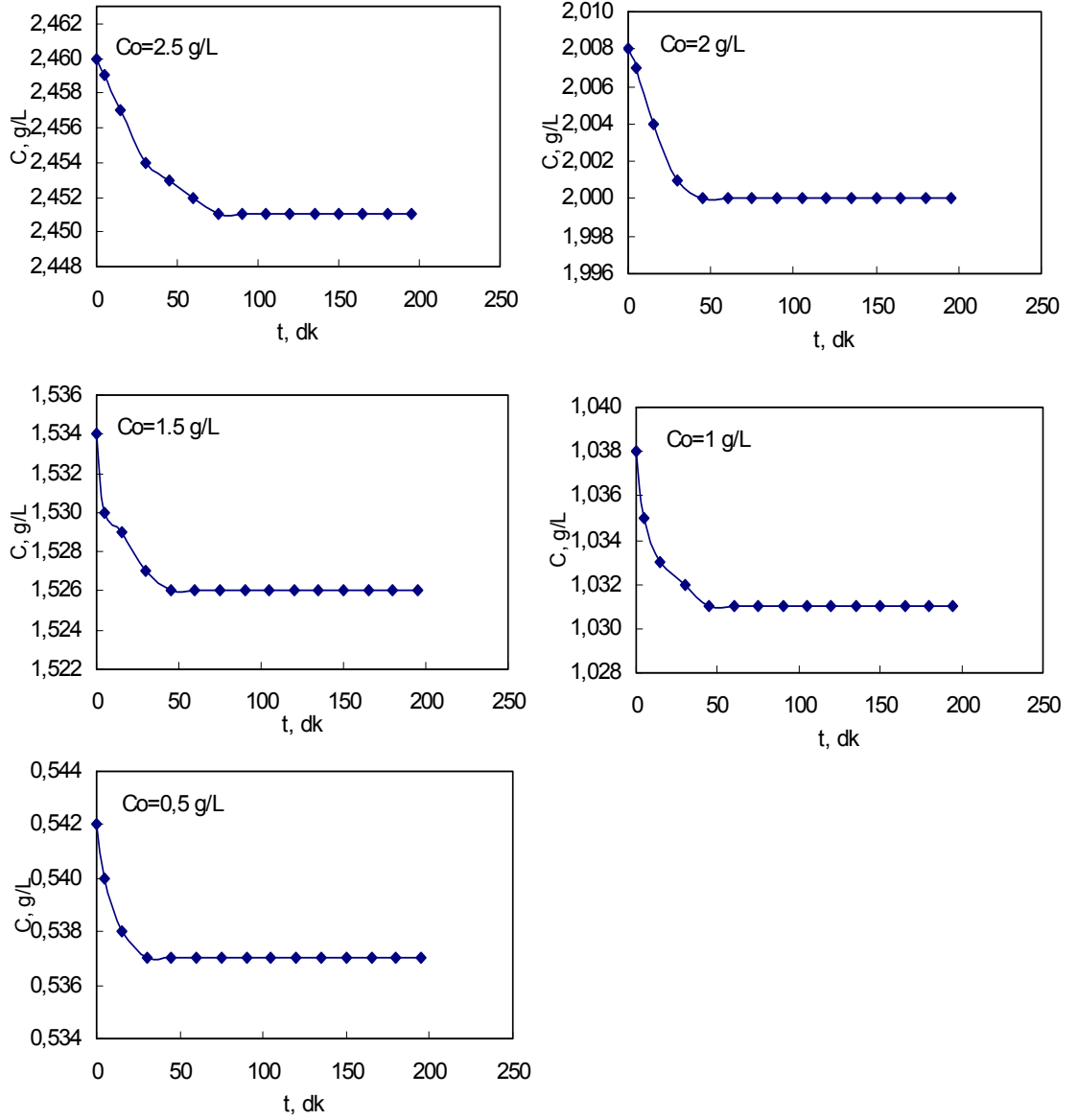
Şekil 5.8. BSA'nın 10 kDa CTA membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



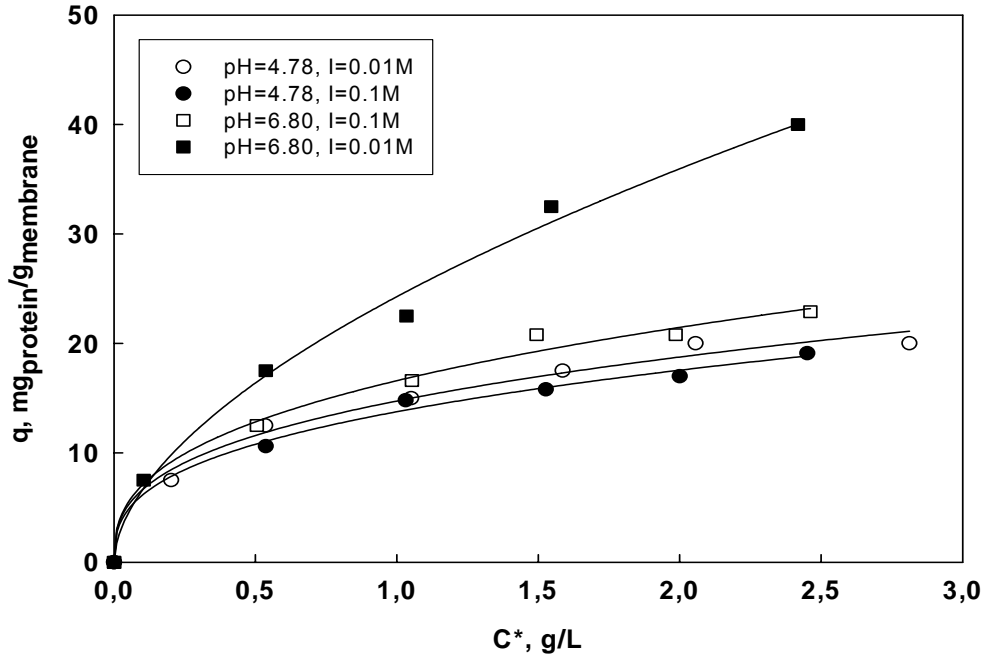
Şekil 5.9. BSA'nın 10 kDa CTA membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



Şekil 5.10. BSA'nın 10 kDa CTA membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



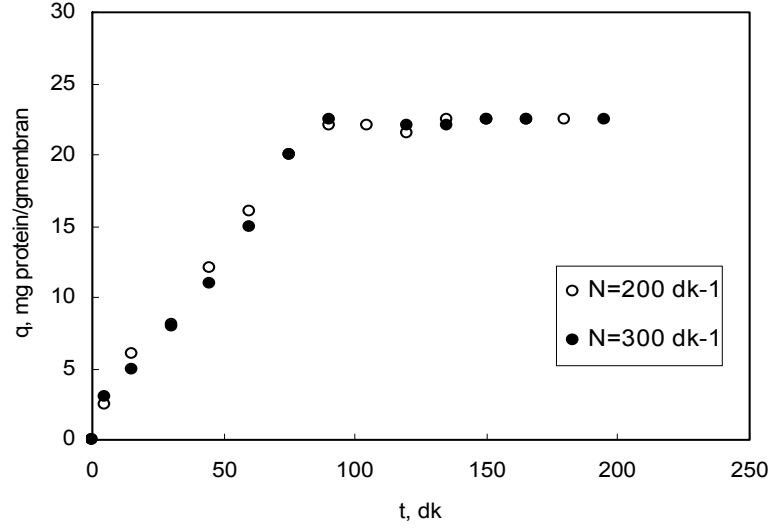
Şekil 5.11. BSA'nın 10 kDa CTA membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



Şekil 5.12. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın 10 kDa CTA membranlara adsorpsiyon denge izotermi

Çizelge 5.2. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın CTA membranlara adsorpsiyon izoterm denklemleri

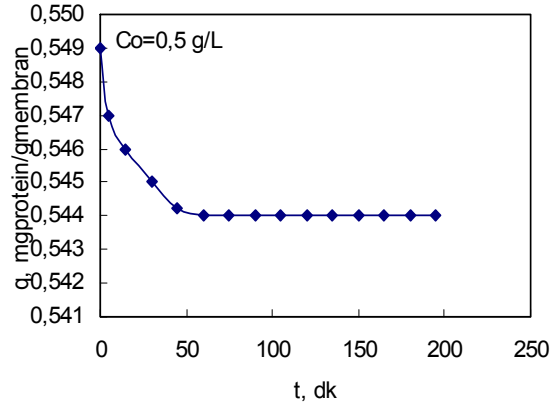
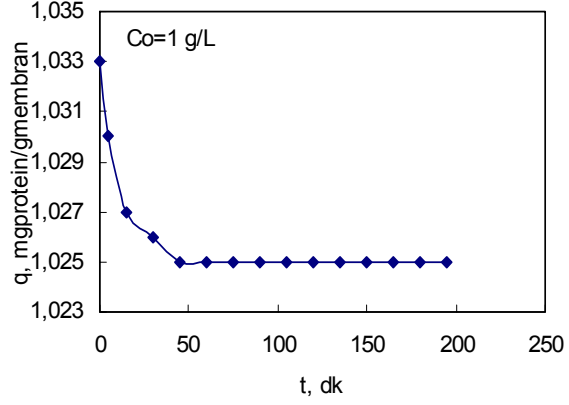
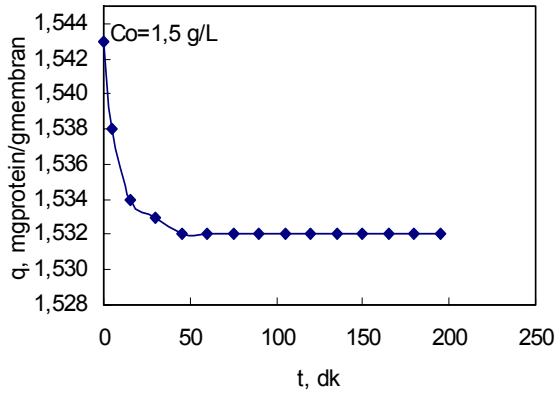
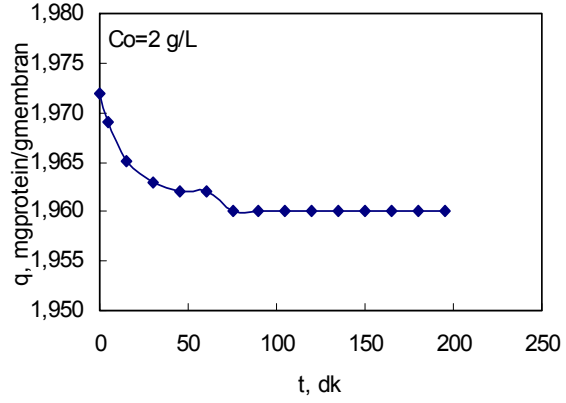
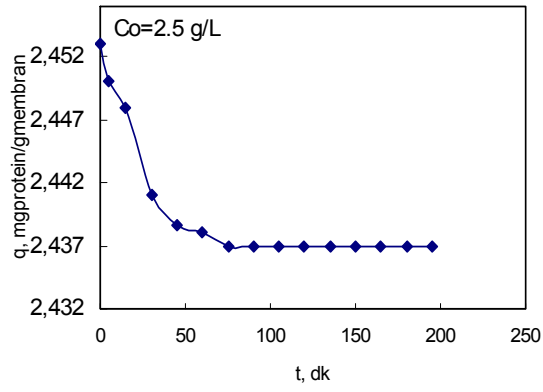
	pH	Adsorpsiyon izotermi			
		0.01M KCl		0.1M KCl	
CTA	4.78	$q=14.52(C^*)^{0.32}$	$R^2=0.98$	$q=13.75(C^*)^{0.36}$	$R^2=0.99$
	6.80	$q=24.27(C^*)^{0.57}$	$R^2=0.99$	$q=16.59(C^*)^{0.37}$	$R^2=0.99$



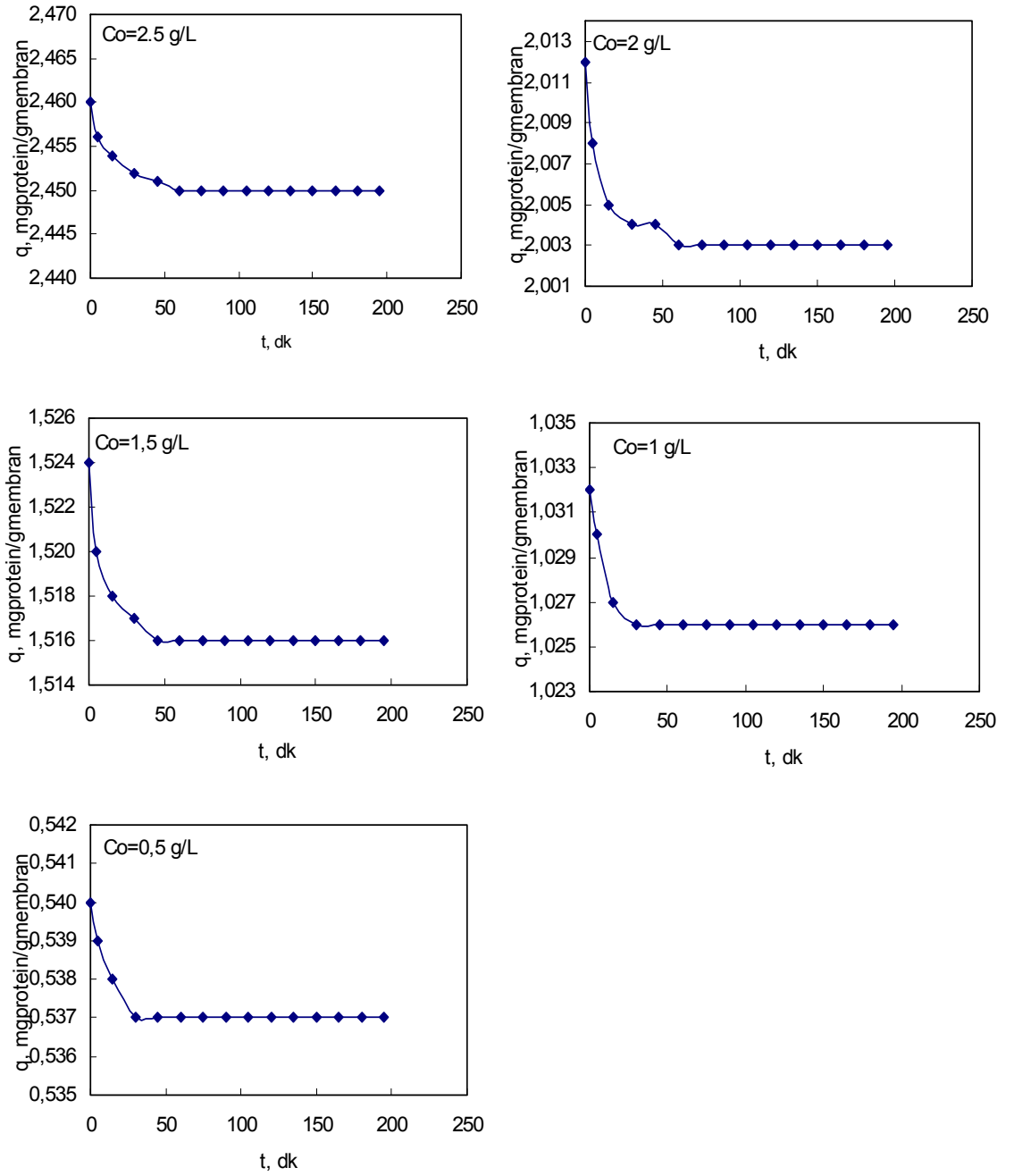
Şekil 5.13.  $C_0=1$  g/L,  $pH= 6.80$  ve  $0.01$  M KCl koşullarında BSA'nın 10 kDa CTA membranlara adsorpsiyonunda karıştırma hızı etkisi

### 5.3. BSA'nın 100 kDa PES Membranlara Adsorpsiyonu

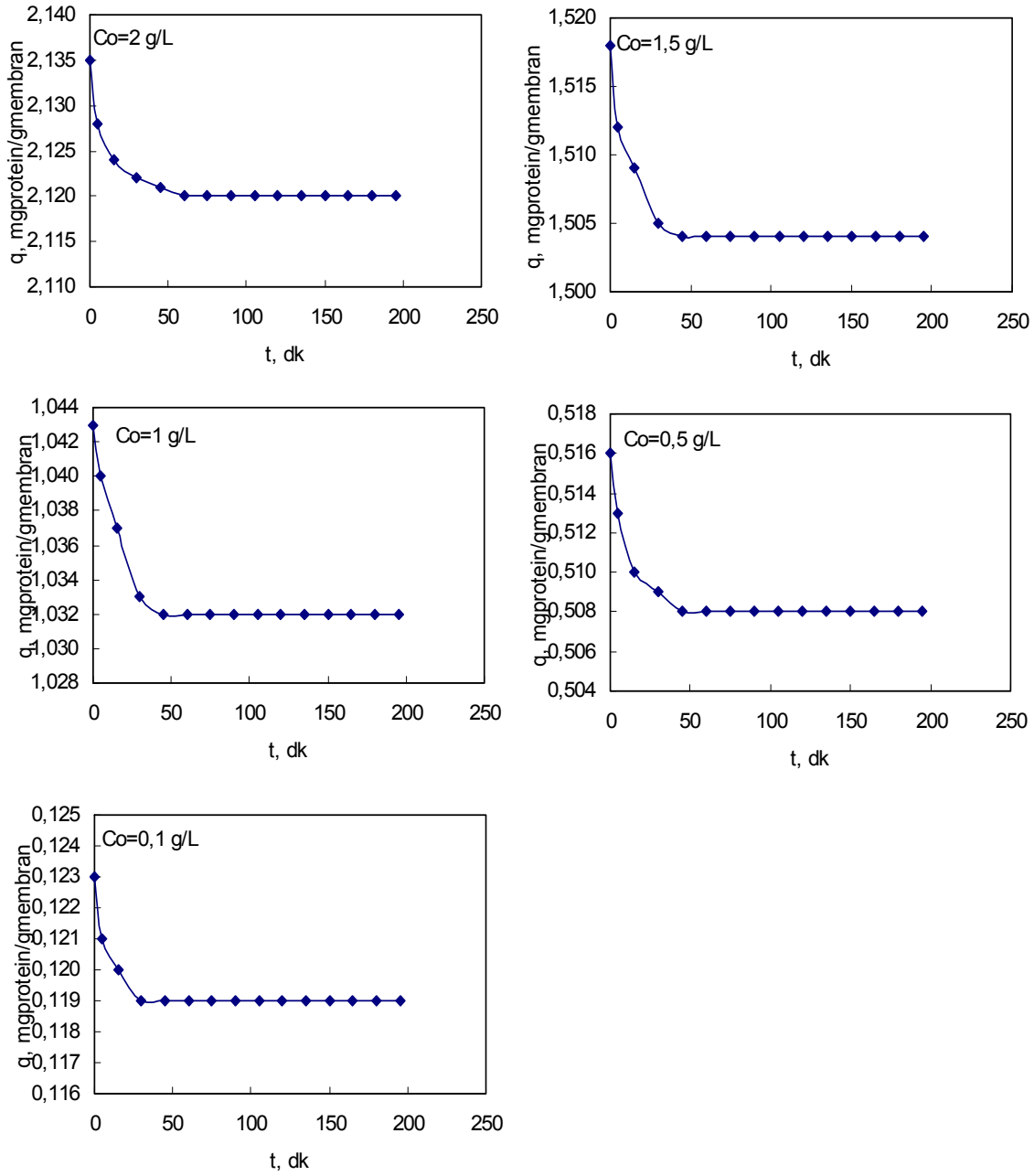
BSA'nın ( $M_A=67$  kDa) 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyon deneyleri, proteinin izoelektrik noktasının altında, izoelektrik noktasında ve üzerindeki pH değerlerinde (sırasıyla 3.78, 4.78= $pI$  ve 6.80),  $0.01$  M ve  $0.1$  M KCl çözeltisi ile sağlanan iyonik gerilimlerde  $C_0=0.5, 1.0, 1.5, 2.0$  ve  $2.5$  g/L başlangıç protein derişimlerinde gerçekleştirilmiştir. Sıvı faz protein derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 5.14-5.19'da verilmiştir. Deney verilerinden yararlanılarak, sıvı faz denge derişimine karşı membrana adsorplanan protein miktarının grafiğe geçirilmesi ile adsorpsiyon denge izotermi farklı pH ve iyonik gerilim değerleri için oluşturulmuştur (Şekil 5.20). Her iki iyonik gerilimde de izoelektrik noktada BSA adsorpsiyonu en az seviyede iken, izoelektrik noktanın altındaki pH değerinde en fazla protein adsorpsiyonu gerçekleşmiştir. Adsorpsiyon izotermelerinin Freundlich izotermine uyduğu belirlenerek sonuçlar Çizelge 5.3'de verilmiştir. İyonik gerilim artması ile her üç pH değerinde de adsorplanan protein miktarında azalma gözlenmiştir.



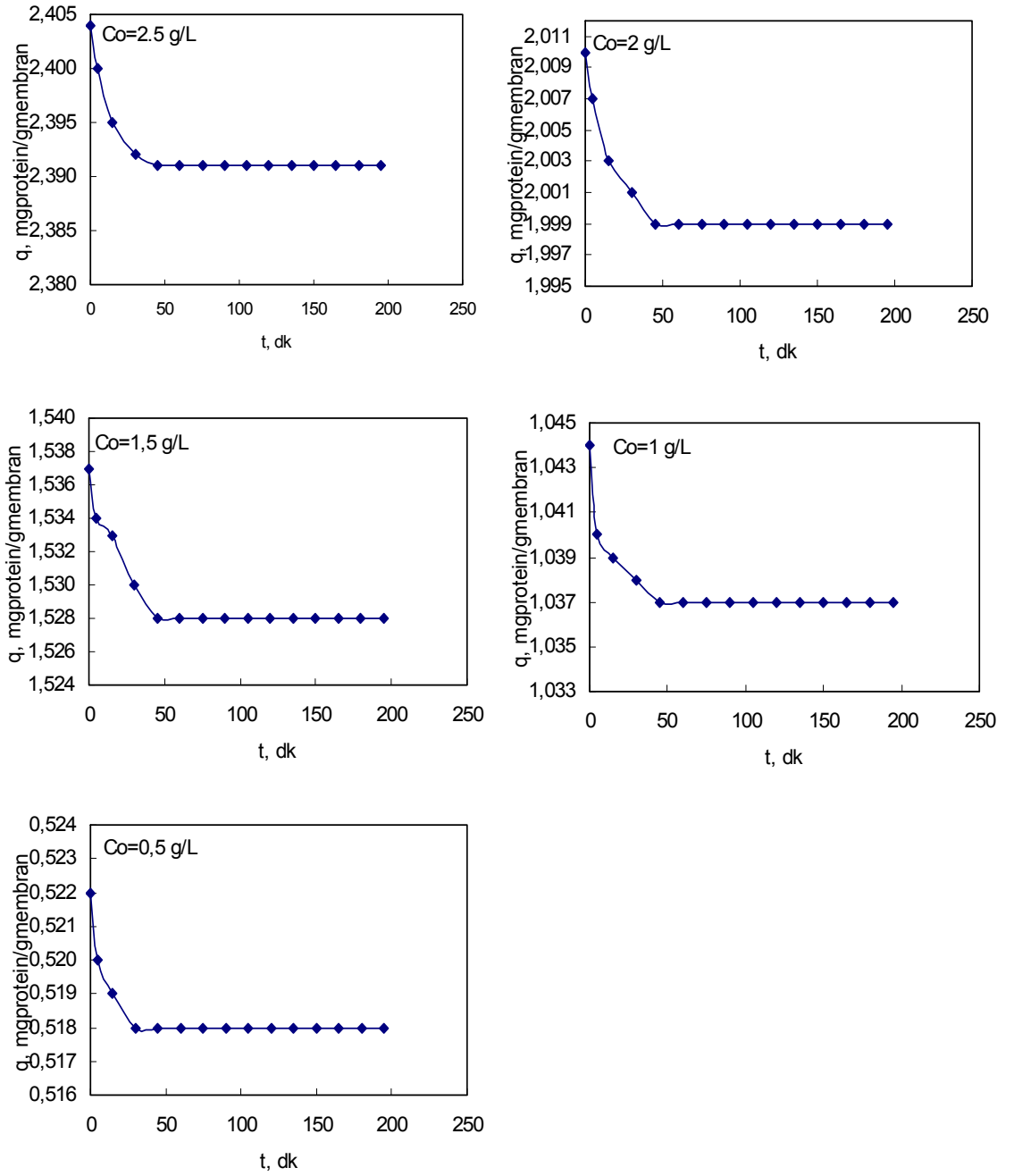
Şekil 5.14. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



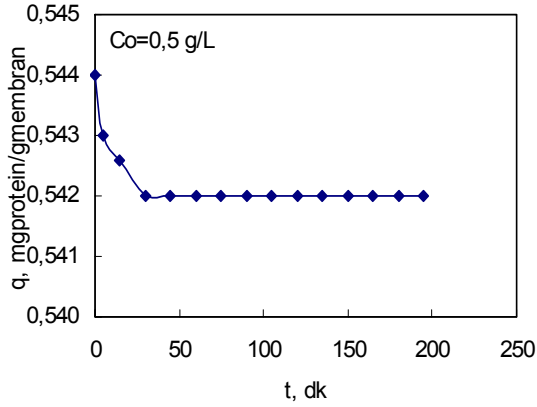
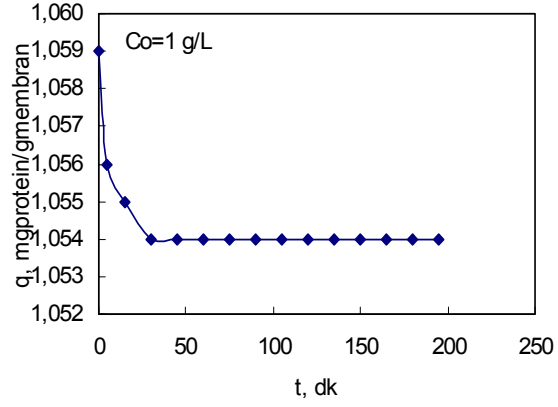
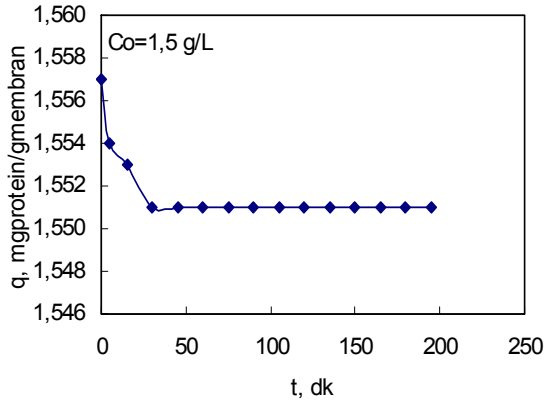
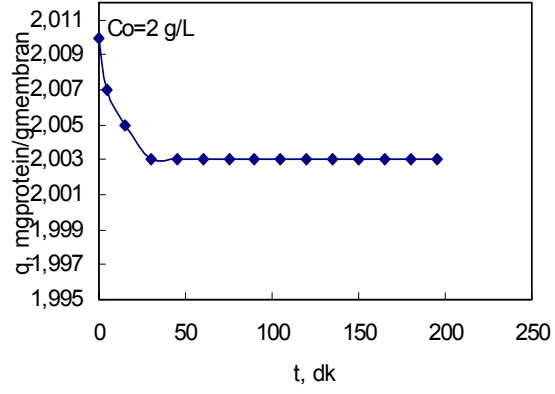
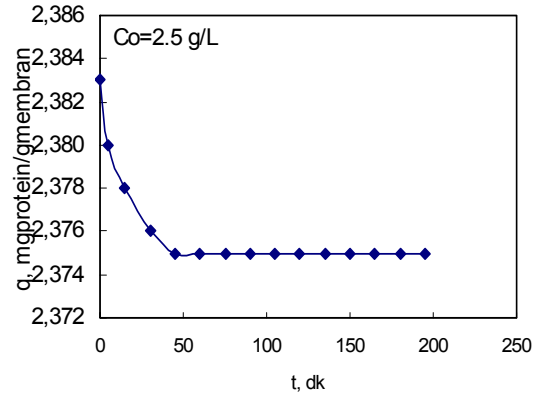
Şekil 5.15. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



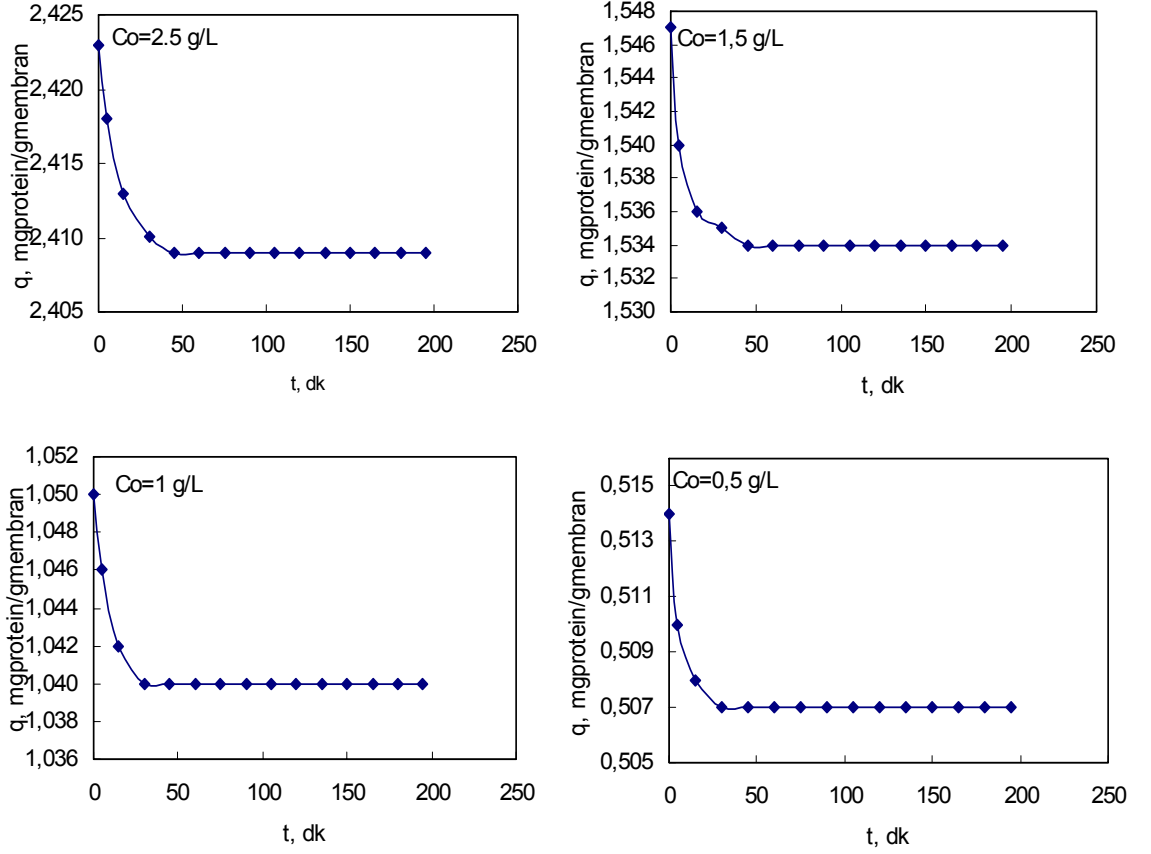
Şekil 5.16. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=3.78 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değışimi



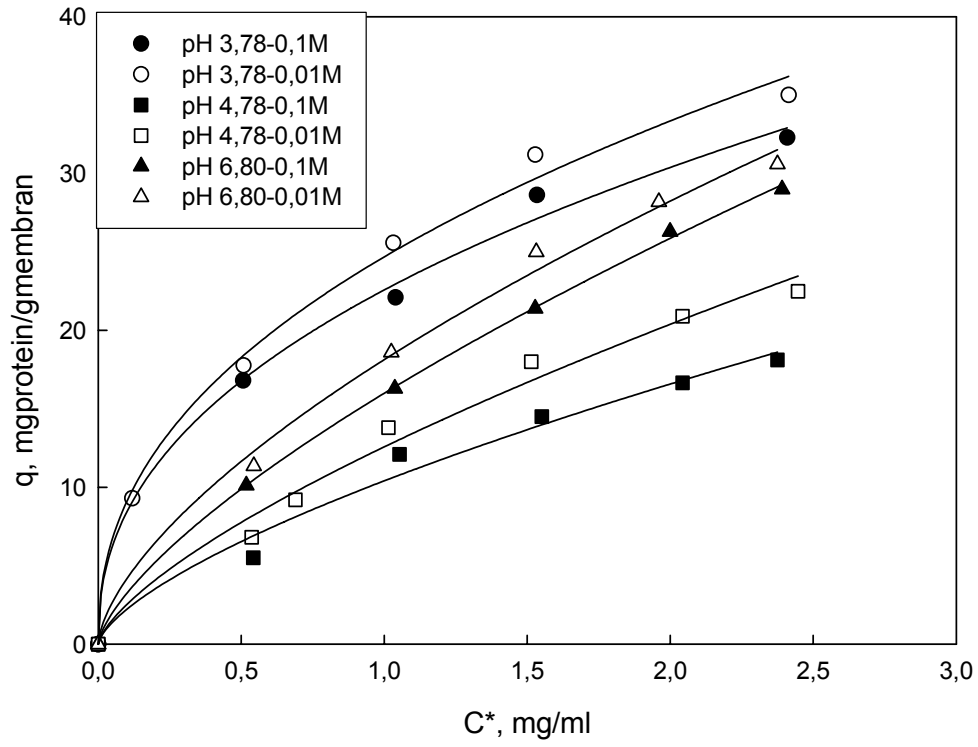
Şekil 5.17. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=6.80 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



Şekil 5.18. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=4.78 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değişimi



Şekil 5.19. BSA'nın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=3.78 ve 0.1 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz protein derişiminin zamanla değışimi



Şekil 5.20. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın 100 kDa PES membranlara adsorpsiyon denge izotermi

Çizelge 5.3. Farklı iyonik çevre koşullarında BSA'nın 100 kDa PES membranlara adsorpsiyon denge izotermi

pH	Adsorpsiyon izoterm denklemleri			
	0.01M KCl		0.1M KCl	
3.78	$q=25.96(C^*)^{0.49}$	$R^2=0.99$	$q=22.58(C^*)^{0.43}$	$R^2=0.99$
4.78	$q=12.65(C^*)^{0.70}$	$R^2=0.99$	$q=10.41(C^*)^{0.67}$	$R^2=0.98$
6.80	$q=18.06(C^*)^{0.69}$	$R^2=0.98$	$q=15.99(C^*)^{0.69}$	$R^2=0.99$

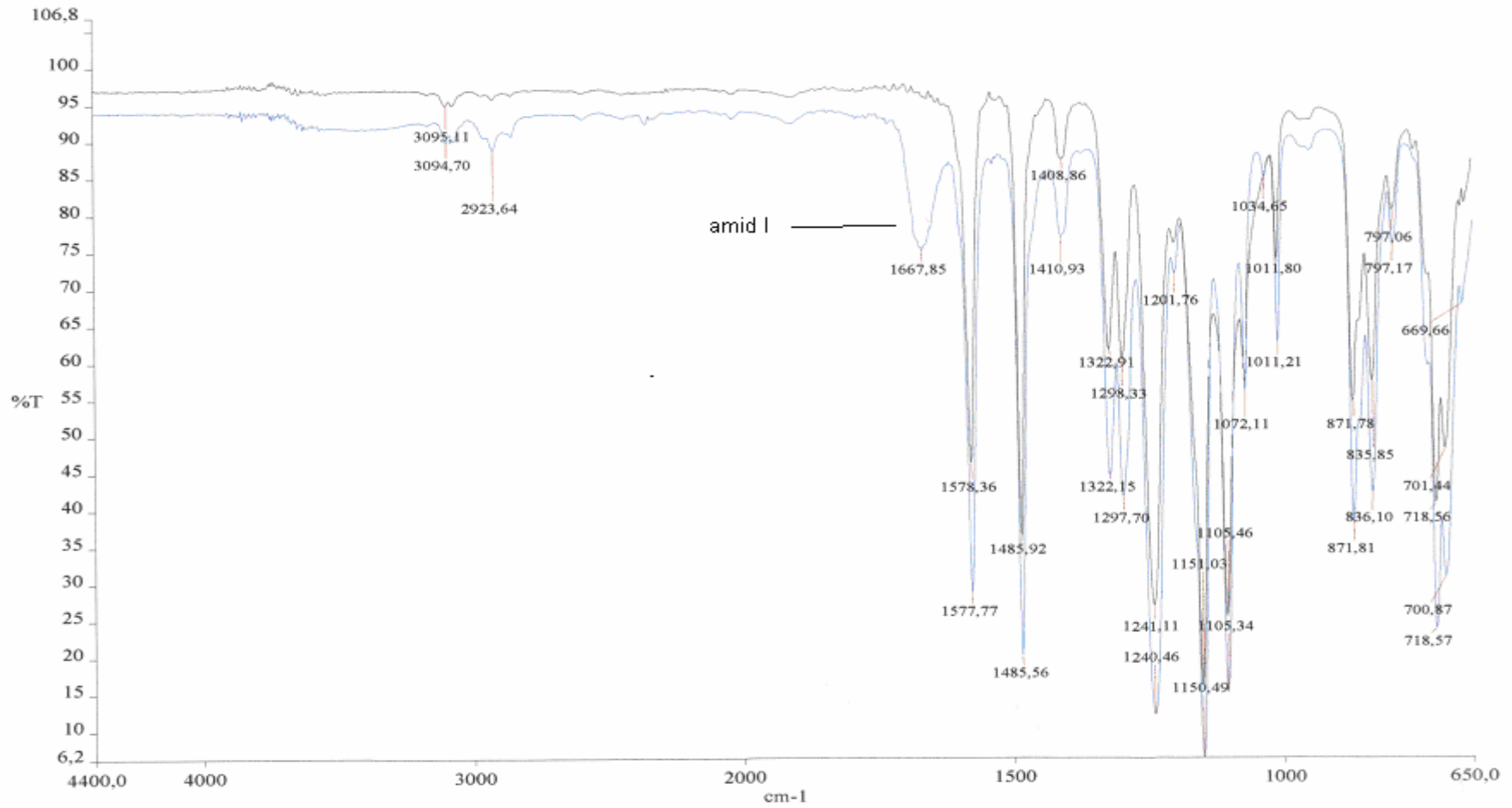
## 5.4. Membranların Yapısında BSA Adsorpsiyonu Sonucu Meydana Gelen Değişimler

BSA'nın farklı iyonik çevrelerde adsorpsiyonu sonucu PES ve CTA membran yüzeylerinde meydana gelen değişimler adsorpsiyon deneylerinde elde edilen bulgularla ilişkilendirilmek ve adsorpsiyonun nedenini açıklamak üzere spektrofotometrik olarak FTIR-ATR ile analizlenmiş; SEM ve AFM fotoğrafları alınmıştır.

### 5.4.1. PES membranların FTIR-ATR analizleri

pH=6.80 ve 0.01 M iyonik gerilim değerlerinde, Co=1 g/L BSA derişiminde protein adsorpsiyonu sonucu kirlenmiş olan 10 kDa PES membranların FTIR-ATR spektrumlarında, temiz membranın yapısından farklı olarak amid I bandı (1640-1670  $\text{cm}^{-1}$ ) gözlenmiştir (Şekil 5.21). Temiz ve kirli membranlarda görülen piklere ait kromofor gruplar Çizelge 5.4'de verilmiştir. Amid I bandları peptid bağı üzerinde bulunan C=O gerilmesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 5.22). pH=3.78 değerinde -aynı iyonik gerilim ve başlangıç protein derişiminde- FTIR-ATR spektrumlarında ise şiddeti diğer iki pH değerine göre fazla olan amid I bandı gözlenmiş; buna ek olarak amid II (1540  $\text{cm}^{-1}$ ) bölgesinde de belirgin pik gözlenmiştir (Şekil 5.23). Amid II bandı peptid bağındaki N-H eğilmesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 5.22). pH=4.78 değerinde ise amid I bandının şiddetinin diğer iki pH değerine göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.24)

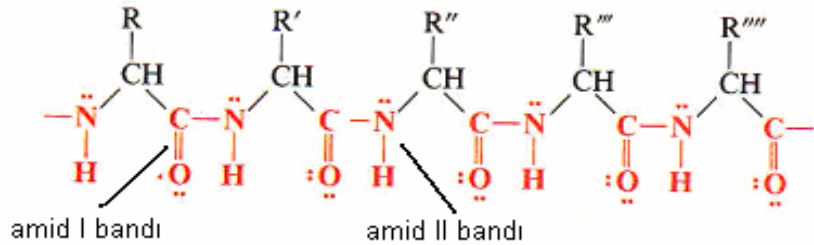
0.01 M ve 0.1 M KCl ile sağlanan iyonik gerilimlerde, iki farklı pH (6.80 ve 4.78) ve Co=1 g/L BSA koşullarında kirlenmiş membranların karşılaştırmalı spektrumları Şekil 5.25-5.26'da verilmiştir. İyonik gerilimin artması ile amid I pikinin şiddeti her iki pH'da da azalmıştır.



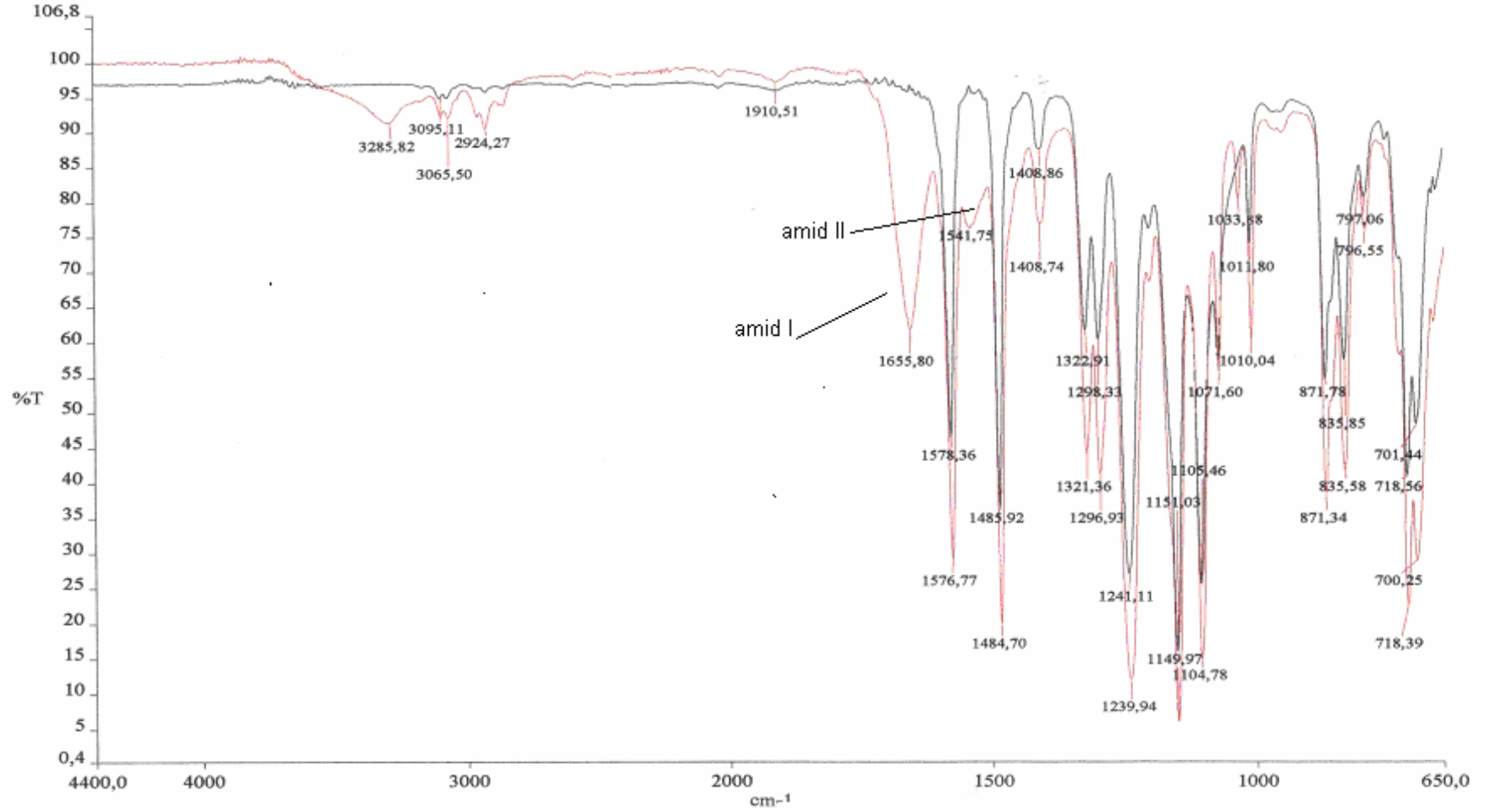
Şekil 5.21. pH=6.80, I=0.01 M koşullarında Co=1 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 10 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu

Çizelge 5.4. Temiz ve BSA ile kirlenmiş PES ve CTA membranların muhtemel kromofor grupları

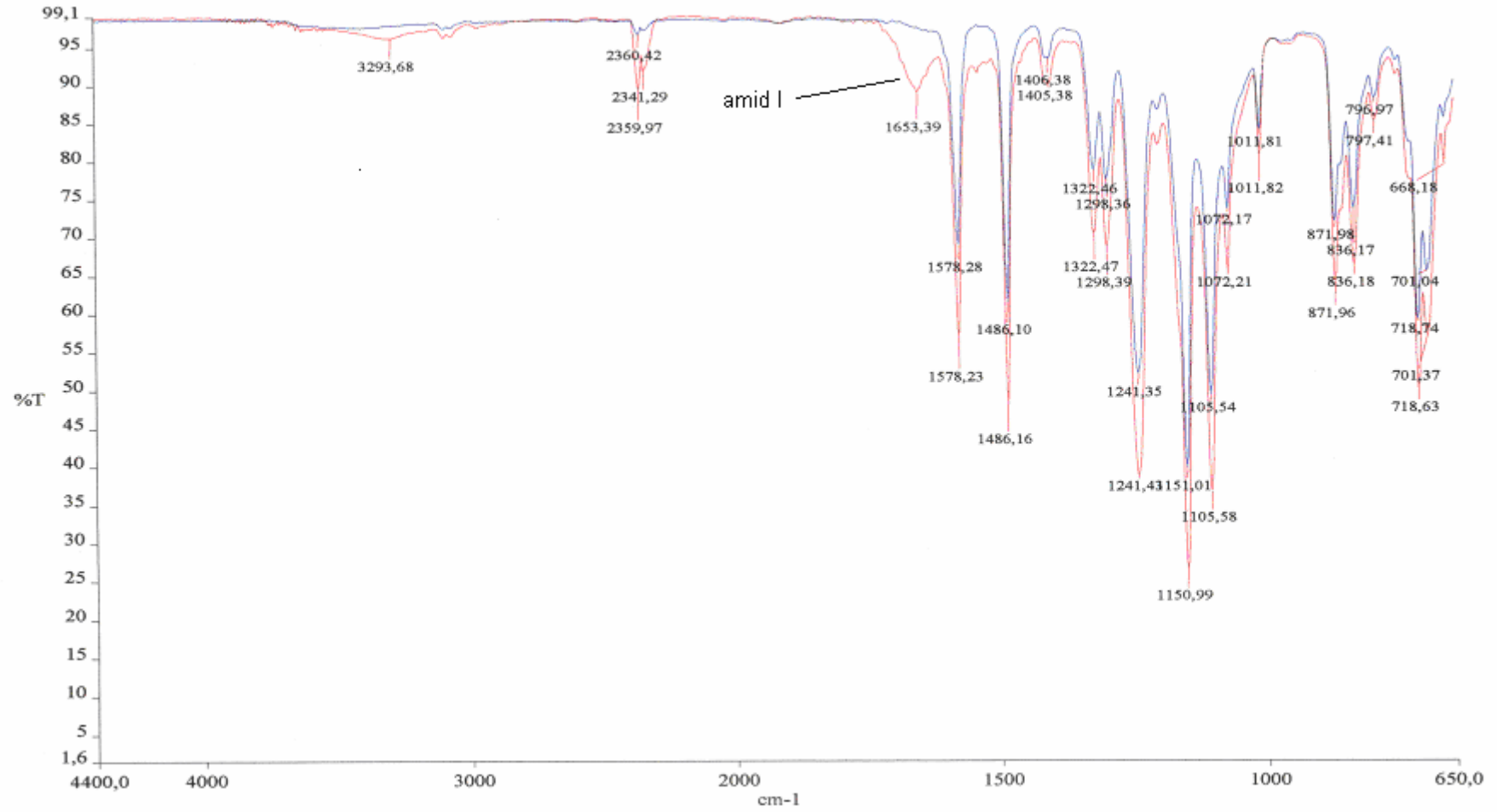
Dalga sayısı, $\text{cm}^{-1}$	Kromofor grup
3285-3260	N-H gerilme titreşimleri (protein)
3030-3100	C-H aromatik gerilme titreşimleri
2920-2860	C-H alifatik gerilme titreşimleri
1745	C=O gerilme titreşimi, ester grubu, CTA
<b>1600-1700</b>	<b>Amid-I, C=O gerilme titreşimi, protein</b>
1578	Aromatik band, PES
1585	C=C aromatik halka gerilme titreşimleri
<b>1535-1540</b>	<b>Amid II, N-H eğilme titreşimleri, protein</b>
1500	C=C aromatik halka gerilme titreşimleri
1490	Aromatik band, PES
1410	C=C, aromatik halka gerilme titreşimleri
1320	Ar-SO <sub>4</sub> -Ar, asimetric gerilme titreşimi
1240	Ar-O-Ar, gerilme titreşimi
1159	C-O-C, simetrik gerilme, CTA
1150	Ar-SO <sub>4</sub> -Ar, simetrik gerilme titreşimi
1105	C-C gerilme titreşimi
1011	C-C gerilme titreşimi
871	C-C gerilme titreşimi
835	C-H, aromatik gerilme titreşimi
760-540	C-Cl gerilme titreşimi



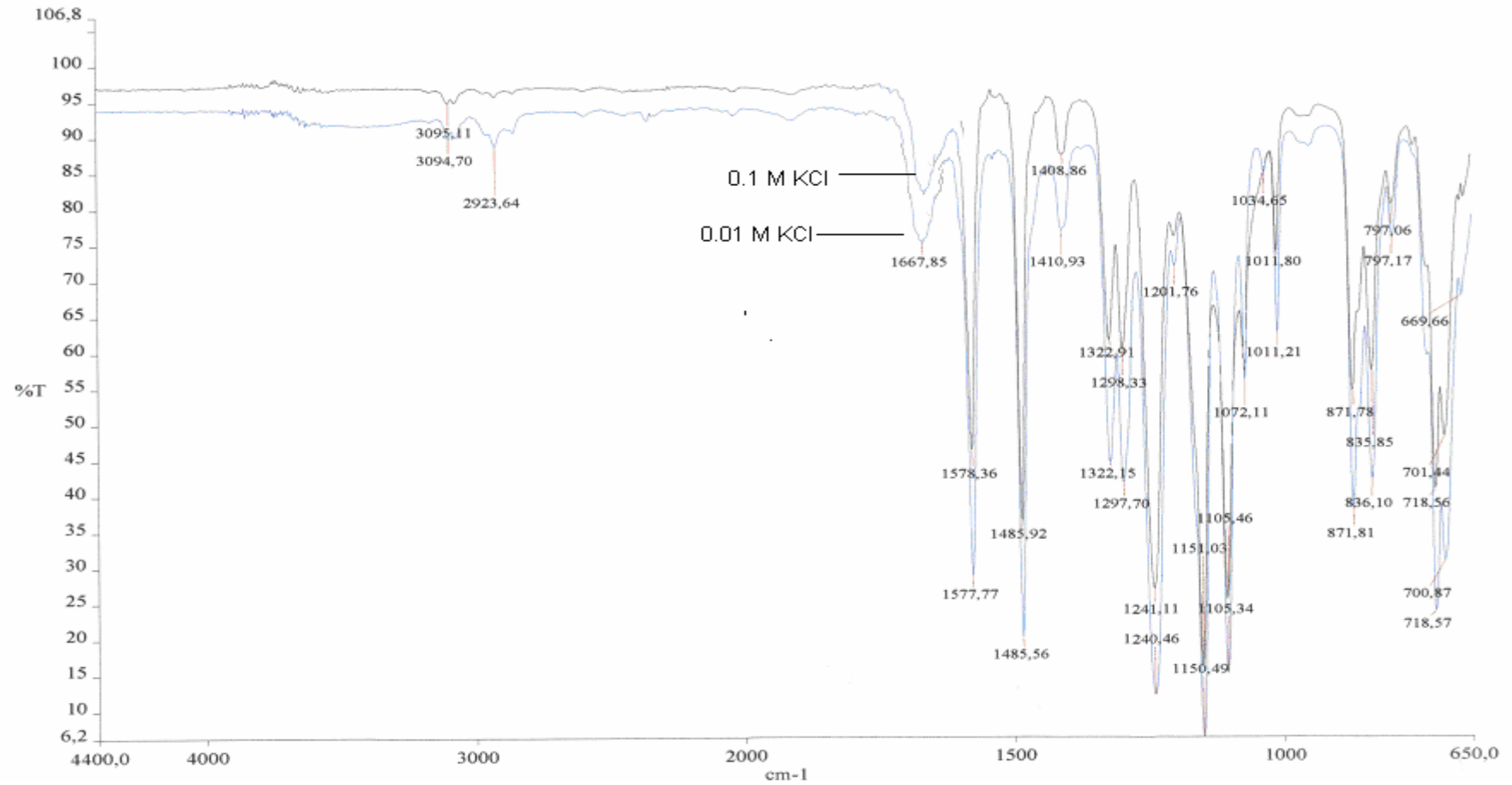
Şekil 5.22. Polipeptid zinciri üzerinde adsorpsiyon yapan gruplar; amid I ve amid II bandları.



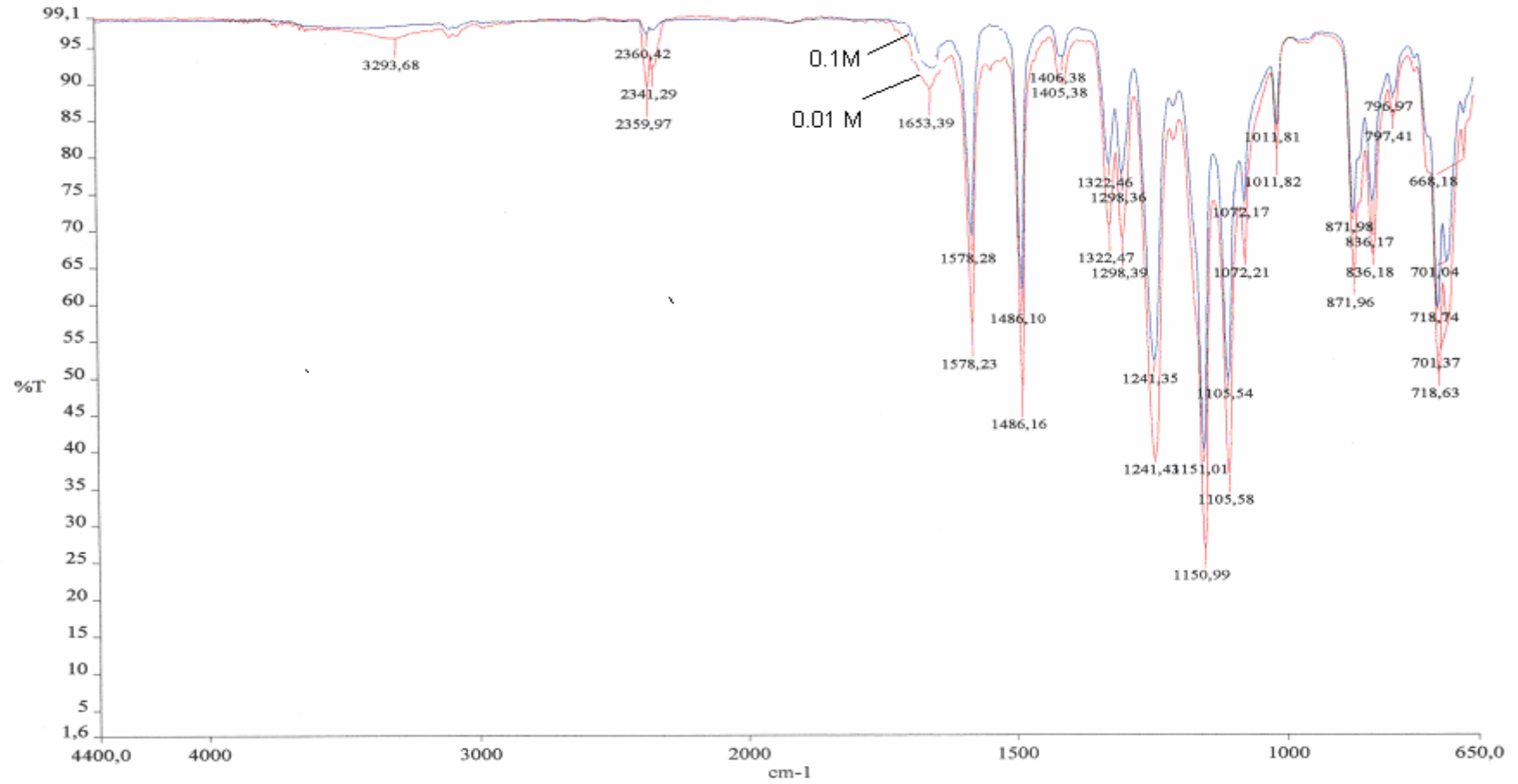
Şekil 5.23. pH=3.78 , I=0.01 M koşullarında Co=1 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 10 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu



Şekil 5.24. pH=4.78, I=0.01 M koşullarında Co=1 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 10 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu



Şekil 5.25. Co=1 g/L BSA derişimi ve pH=6.80 koşullarında 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim koşullarında kirlenmiş membranların karşılaştırmalı spektrumu



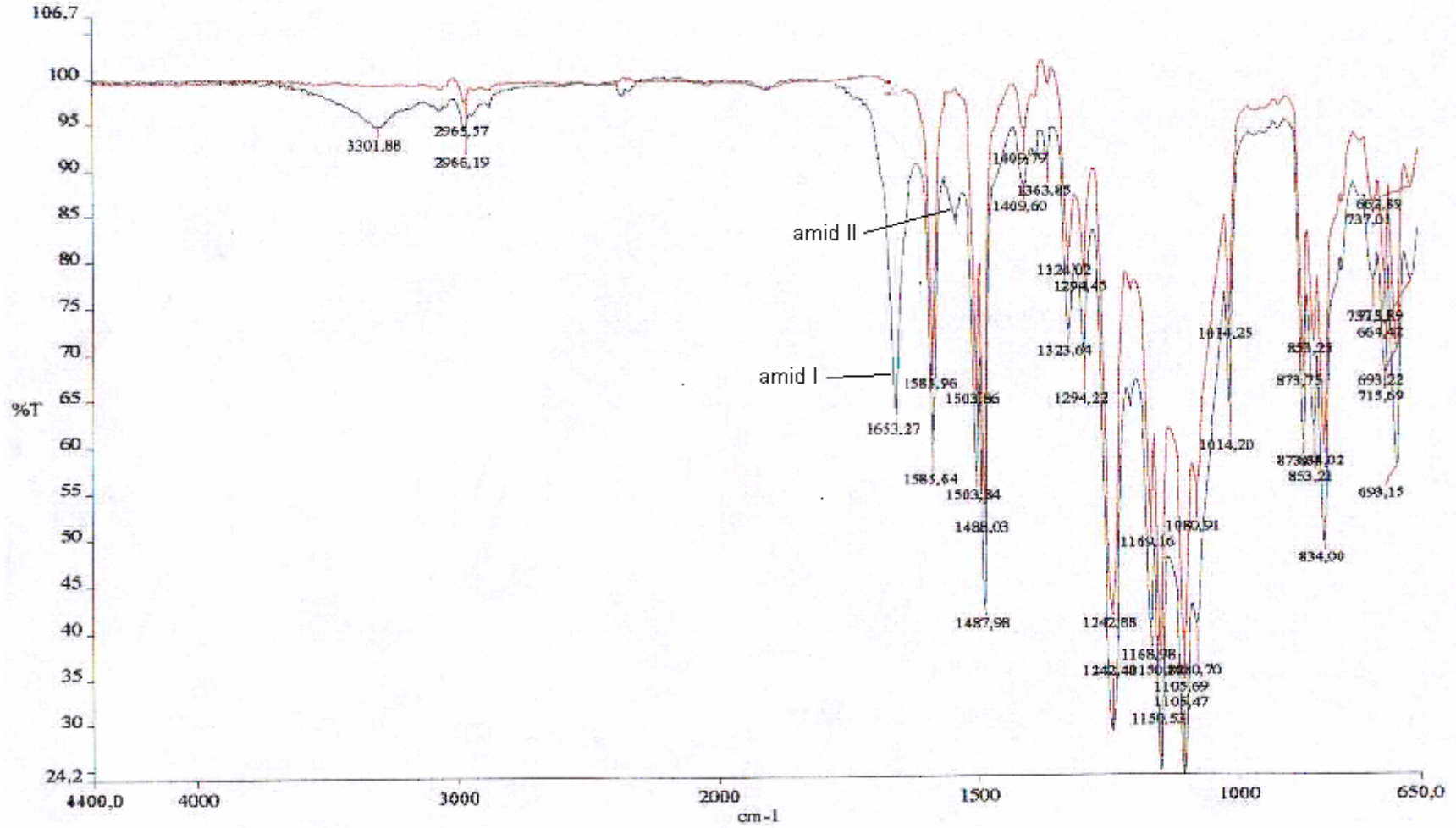
Şekil 5.26. Co=1g/L BSA derişimi ve pH=4.78 koşullarında 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim koşullarında kirlenmiş membranların karşılaştırmalı spektrumu

100 kDa PES membranların 0.01 M iyonik gerilim, pH= 3.78, 4.78 ve 6.80 değerlerinde  $C_o=2.5$  g/L BSA ile kirlenmiş FTIR-ATR spektrumları Şekil 5.27-5.29'da verilmiştir. Çalışılan tüm koşullarda amid I ve amid II pikleri gözlenmiş ve ortam pH ve iyonik geriliminin pik Şiddeti zerine etkisi belirlenmiştir. pH=3.78'de amid I piklerinin Şiddeti fazla, pH=4.78'de ise amid I piklerinin Şiddeti azdır.

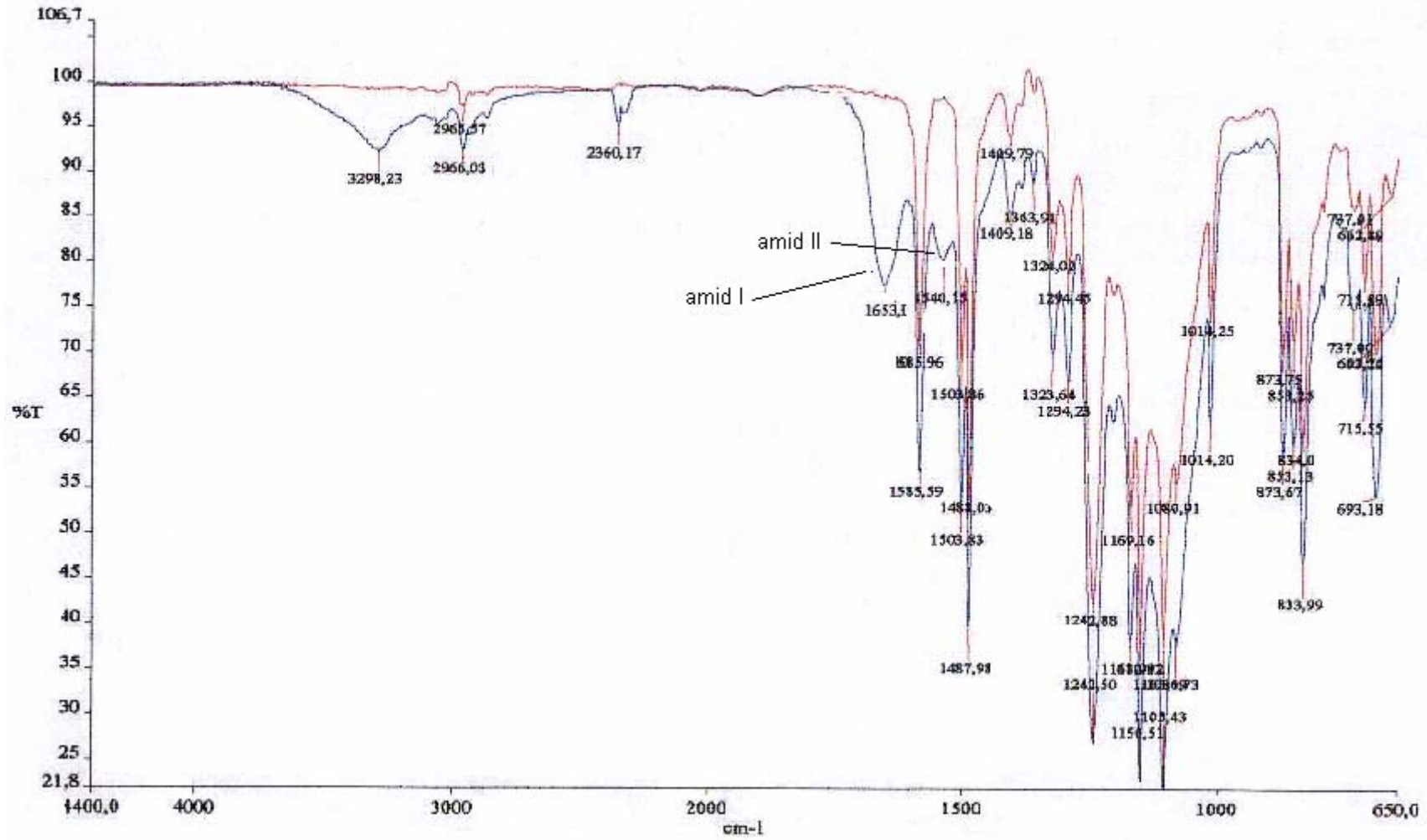
0.1 M KCl derişiminde iyonik gerilim, pH=4.78 ve 6.80, ve  $C_o=2.5$  g/L BSA koşulunda kirlenmiş 100 kDa PES membranların aynı koşullarda 0.01 M KCl derişimindeki iyonik gerilimde elde edilen karşılaştırmalı spektrumları Şekil 5.30-5.31'de verilmiştir. İyonik gerilimin artması ile membran yüzeyinde protein varlığının bir göstergesi olan amid I pikinin Şiddeti -10 kDa PES membranda olduğu gibi- her iki pH'da da azalmıştır.

#### **5.4.2. CTA membranların FTIR-ATR analizleri**

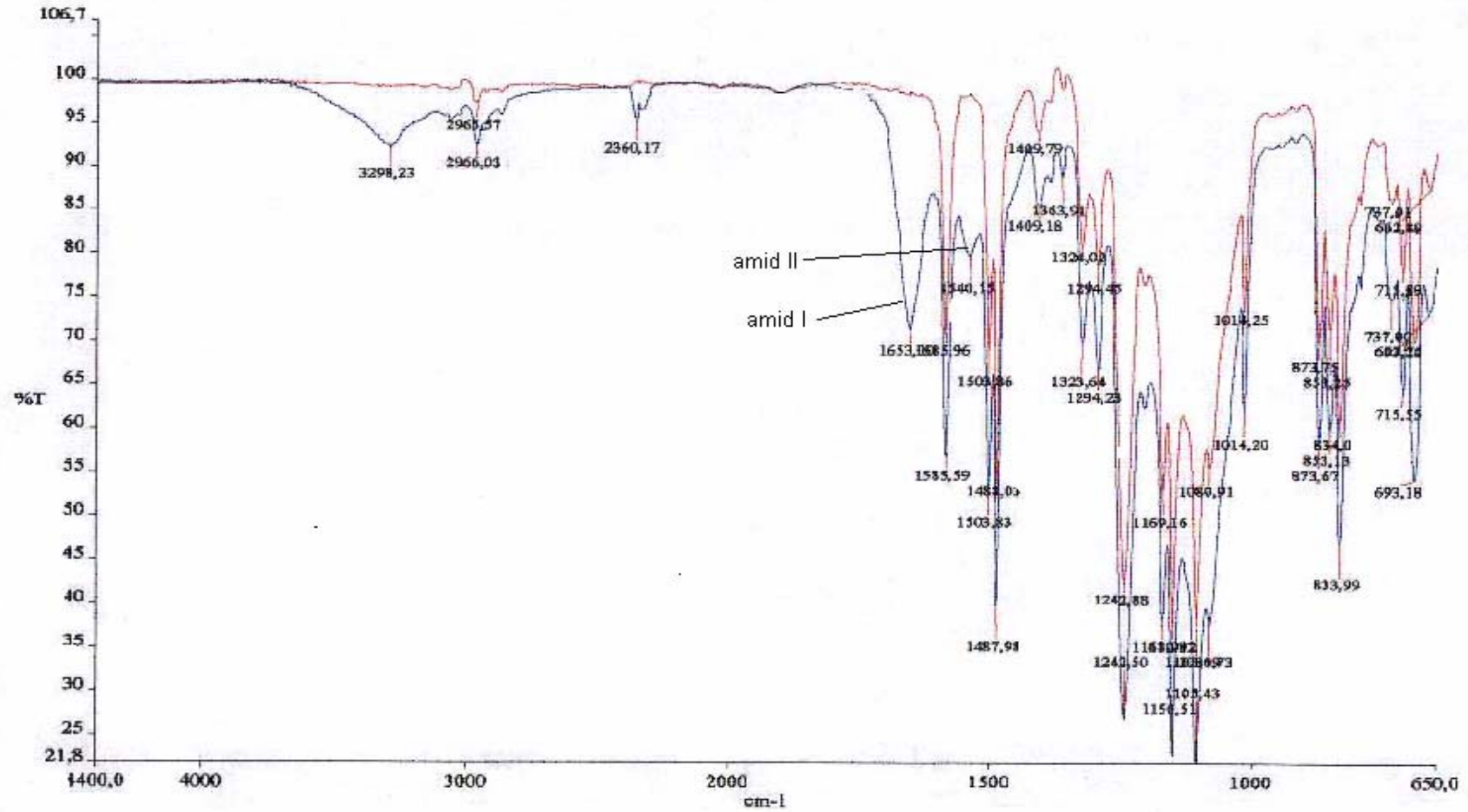
$C_o=1$  g/L başlangıç derişiminde BSA adsorpsiyonu sonucu 10 kDa CTA membranların yüzeyinde meydana gelen değişimler FTIR-ATR spektrofotometresi ile analizlenmiş, pH= 4.78 ve 6.80 değerlerinde protein adsorpsiyonu ile kirlenmiş olan CTA membranda temiz membranın yapısından farklı olarak amid I ( $1640-1670\text{ cm}^{-1}$ ) bandı gözlenmiştir (Şekil 5.32, 5.33). Gözlenen bu pikin Şiddeti PES membranlardaki kadar güçlü değildir. PES membrana göre CTA membranda daha az adsorpsiyon meydana geldiğini, piklerin Őiddetinden de anlamak mümkündür.



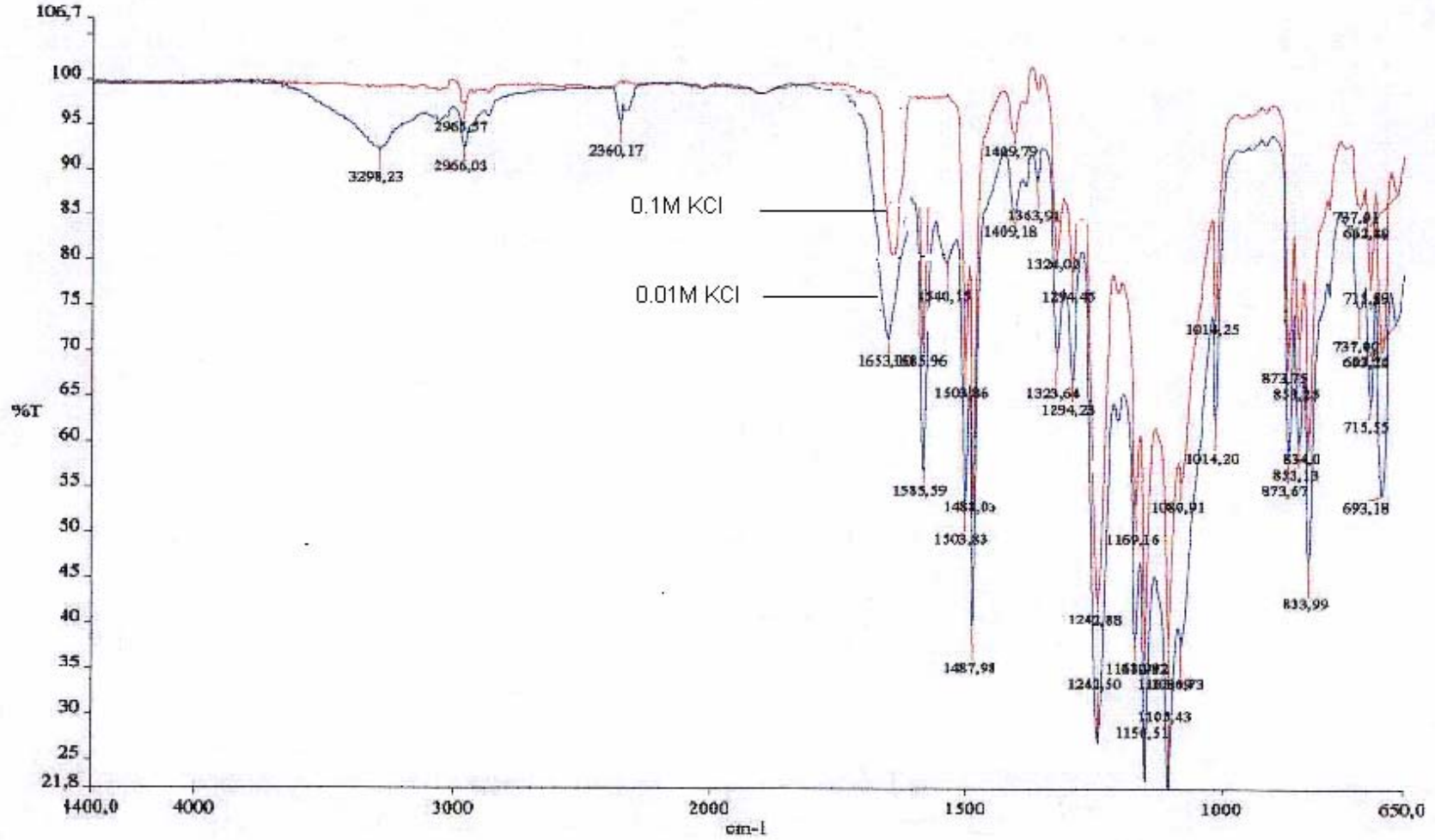
Şekil 5.27. pH=3.78, I=0.01 M koşullarında Co=2.5 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 100 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu



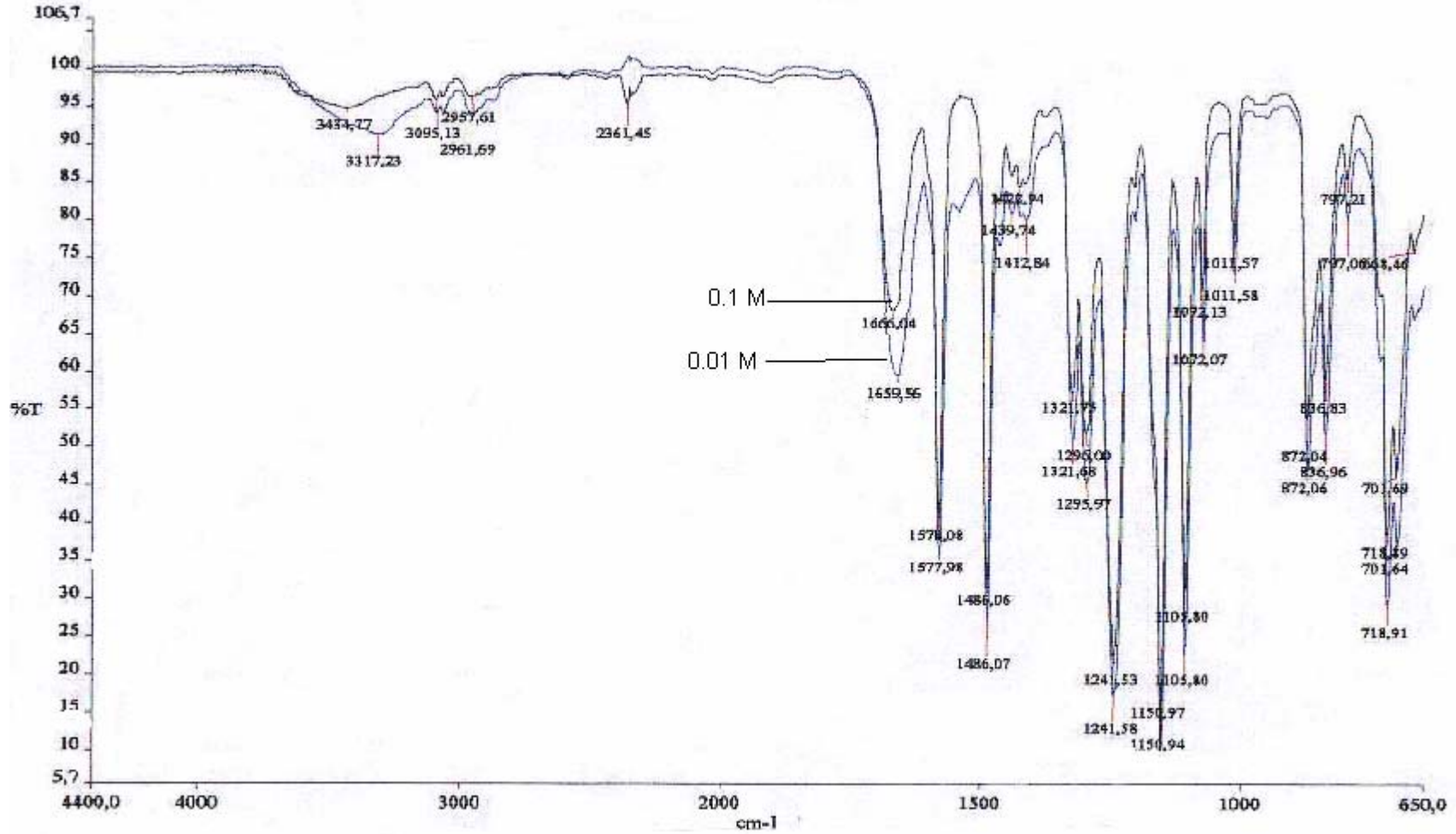
Şekil 5.28. pH=4.78, I=0.01M koşullarında Co=2.5 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 100 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu



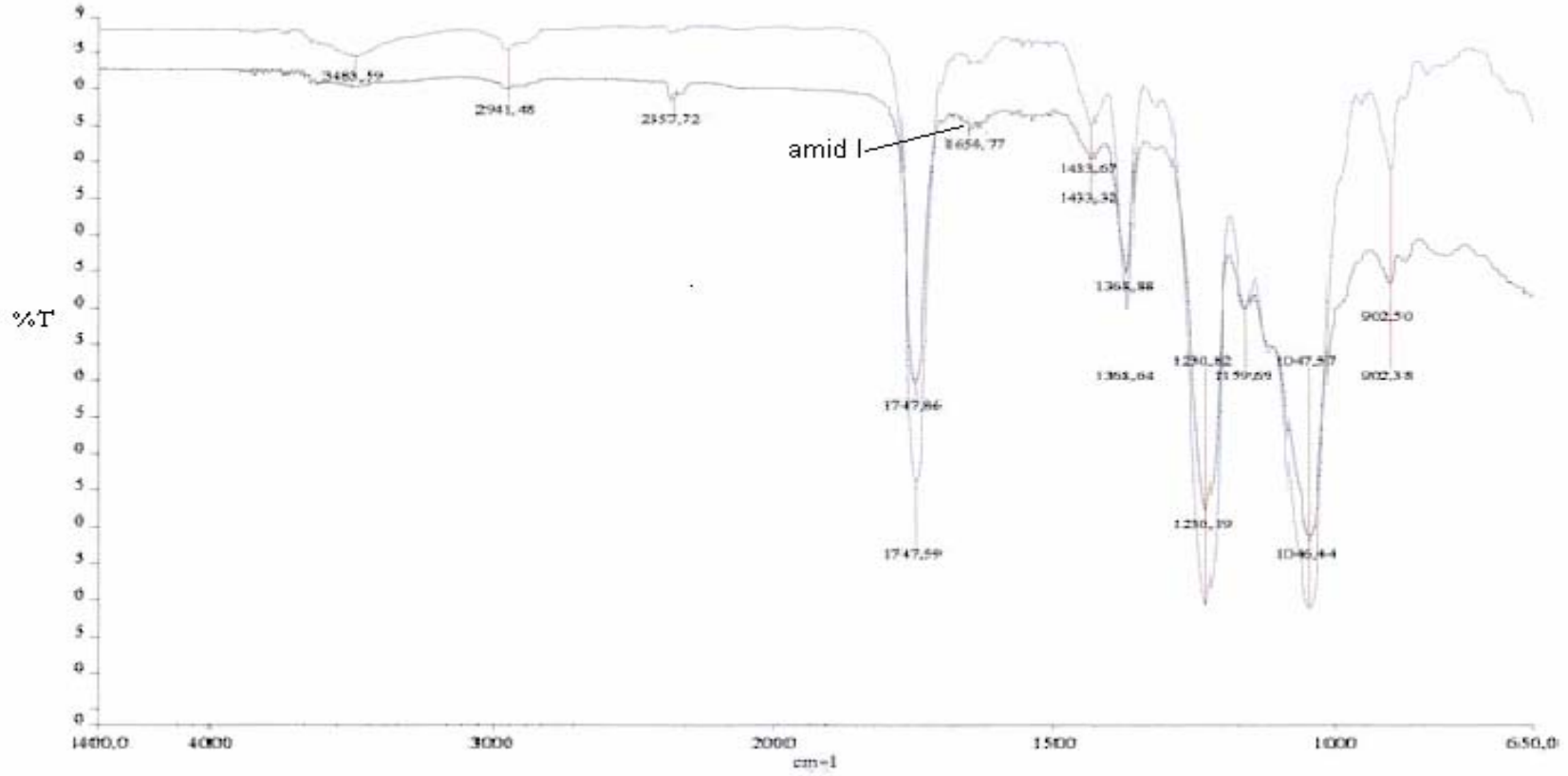
Şekil 5.29. pH=6.80, I=0.01 M koşullarında Co=2.5 g/L BSA ile kirlenmiş ve temiz 100 kDa PES membran karşılaştırmalı spektrumu



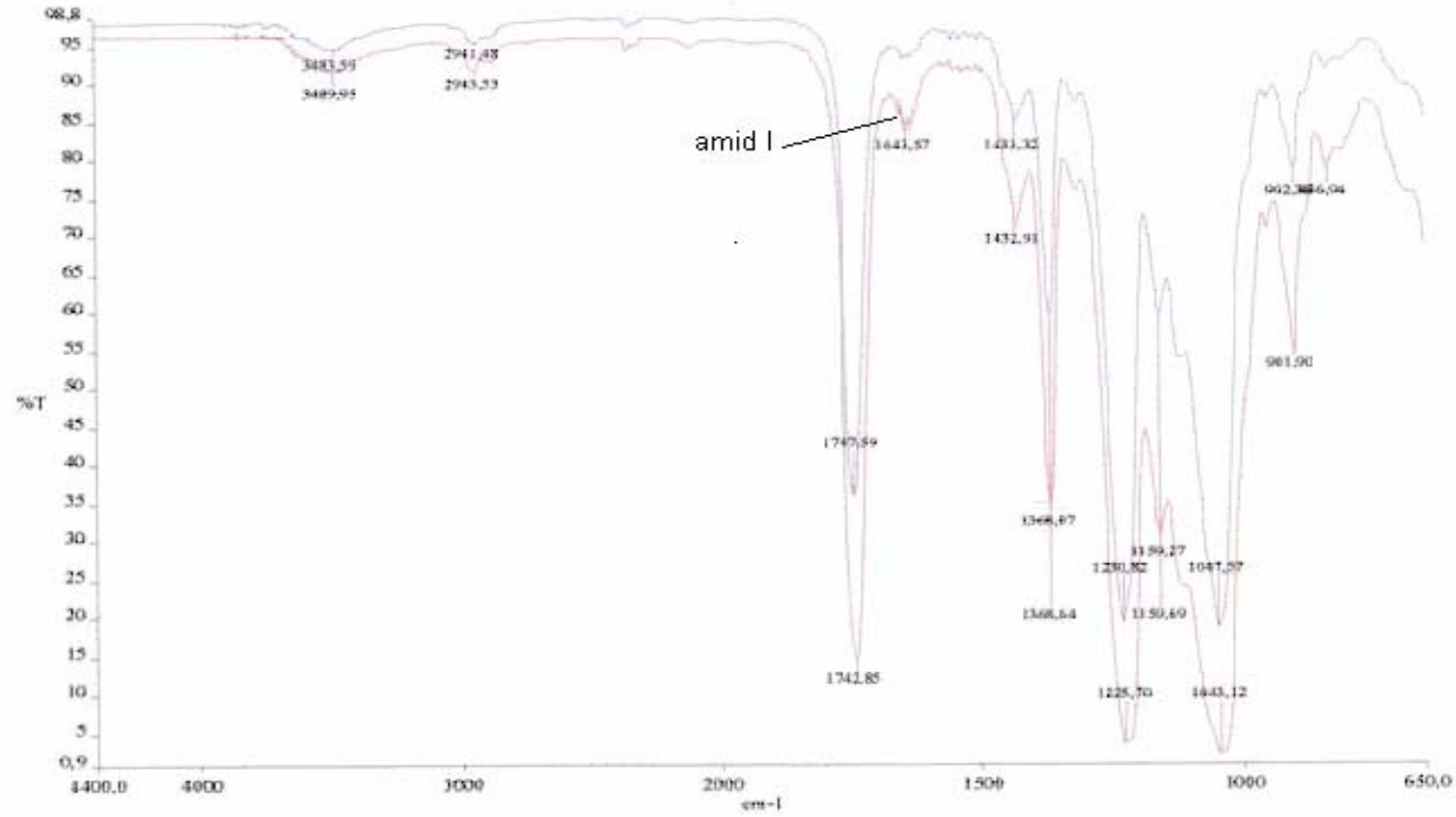
Şekil 5.30. Co=2.5 g/L BSA derişimi ve pH=6.80 koşullarında 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim koşullarında kirlenmiş 100 kDa PES membranların karşılaştırılmalı spektrumu



Şekil 5.31. Co=2.5 g/L BSA derişimi ve pH=3.78 koşullarında 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim koşullarında kirlenmiş 100 kDa PES membranların karşılaştırmalı spektrumu



Şekil 5.32. pH=4.78, I= 0.01 M ve Co=1 g/L BSA koşullarında kirlenmiş ve temiz 10 kDa CTA membranının FTIR-ATR spektrumu

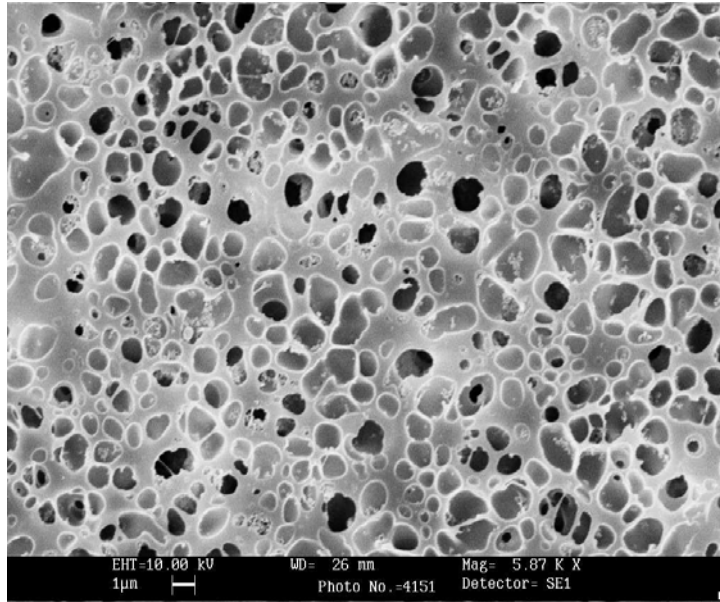


Şekil 5.33. pH=6.80, I=0.01M ve Co=1g/L BSA ve kirlenmiş 10 kDa CTA ve temiz membranın FTIR-ATR spektrumu

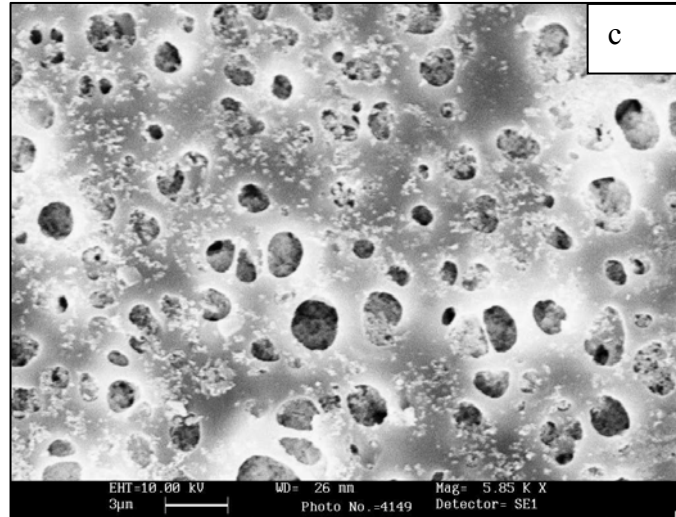
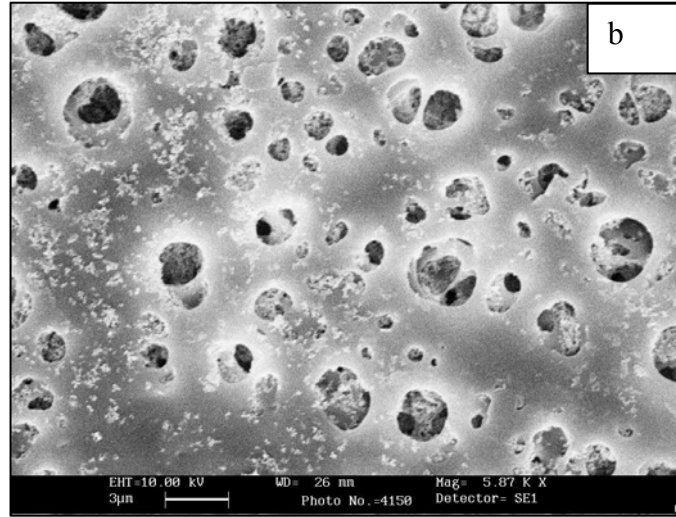
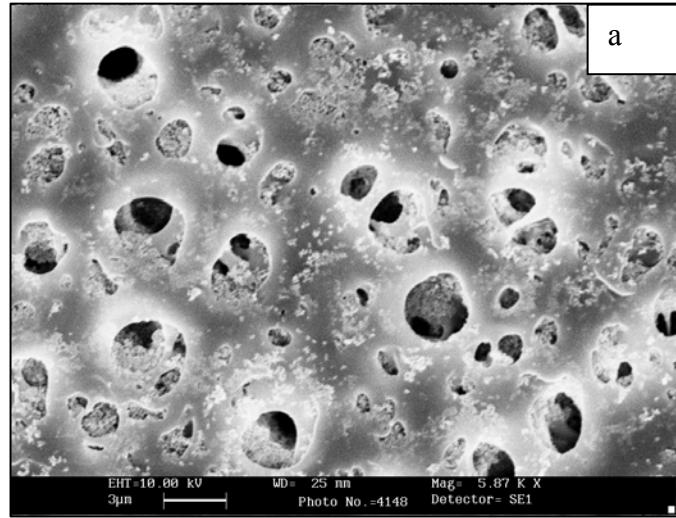
### 5.4.3. PES membranların SEM analizleri

Temiz ve kirli PES membranların SEM analizleri yapılarak membran yüzey yapısındaki değişimler belirlenmiştir. 0.01 M KCl , Co=1g/L BSA ve pH=3.78 koşullarında protein adsorpsiyonu sonucu kirlenmiş olan 10 kDa PES membranın SEM fotoğrafından membran yüzeyinin jel şeklinde protein tabakası ile kaplı olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.34).

100 kDa PES membranın SEM analizlerinde ise 0.01 M KCl ortamında, Co=2 g/L BSA derişiminde, pH=3.78 ve 4.78 değerlerinde kirlenmiş membranlar kullanılmıştır. SEM fotoğraflarından temiz membranın gözeneklerinin açık olduğu gözlenirken (Şekil 5.35(a)), proteinin membran yüzeyine ve gözenek içine adsorpsiyonundan dolayı membranların gözeneklerinin kısmen dolu ve gözenek çaplarının küçüldüğü belirlenmiştir (Şekil 5.35 b-c). pH=3.78'de protein adsorpsiyonu, pH=4.78'e göre fazla olduğu için bu pH değerinde membran fiziksel yapısında daha belirgin değişimler gözlenmiş ve gözenek çapları küçülmüştür.



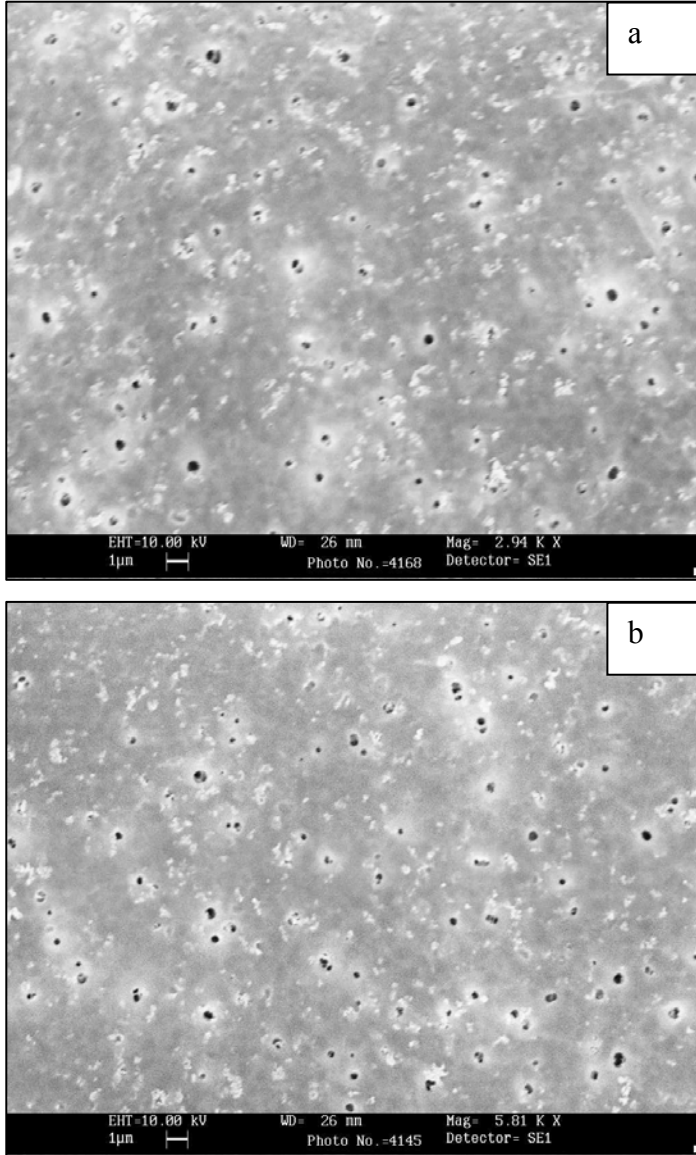
Şekil 5.34. 10 kDa PES membranın Co=1g/L BSA ve pH=3.78 koşullarında kirlenmiş SEM fotoğrafı



Şekil 5.35. 100 kDa PES membran SEM fotoğrafları; temiz (a) 0.01M KCl, Co=2g/L BSA ile kirlenmiş (b) pH=4.78 (c) pH=3.78

#### 5.4.4. CTA membranların SEM analizleri

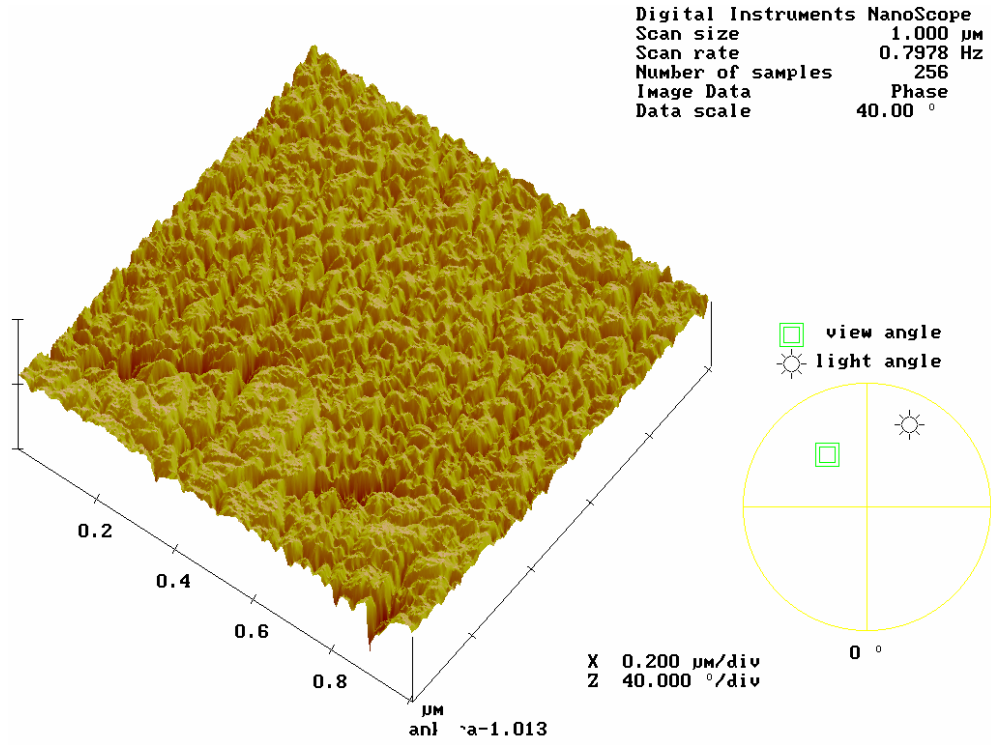
Temiz ve 0.01 M KCl çözeltisi içinde, pH=6.80 koşullarında ve Co=1.5 g/L BSA ile kirlenmiş 10 kDa CTA membranların SEM fotoğraflarında yüzey yapısı ve gözenek çapları arasında belirgin bir fark gözlenememiştir (Şekil 5.36).



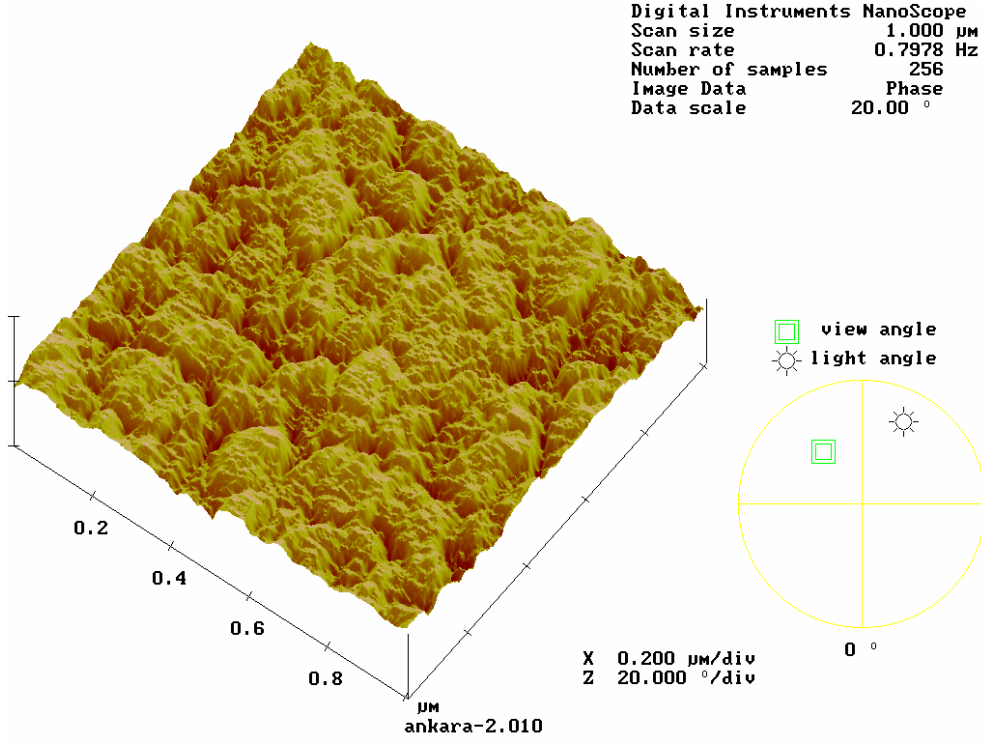
Şekil 5.36. 10 kDa CTA membran SEM fotoğrafları  
(a) Temiz (b) pH=6.80, 0.01M KCl, Co=2g/L BSA ile kirlenmiş

#### 5.4.5. PES membranların AFM analizleri

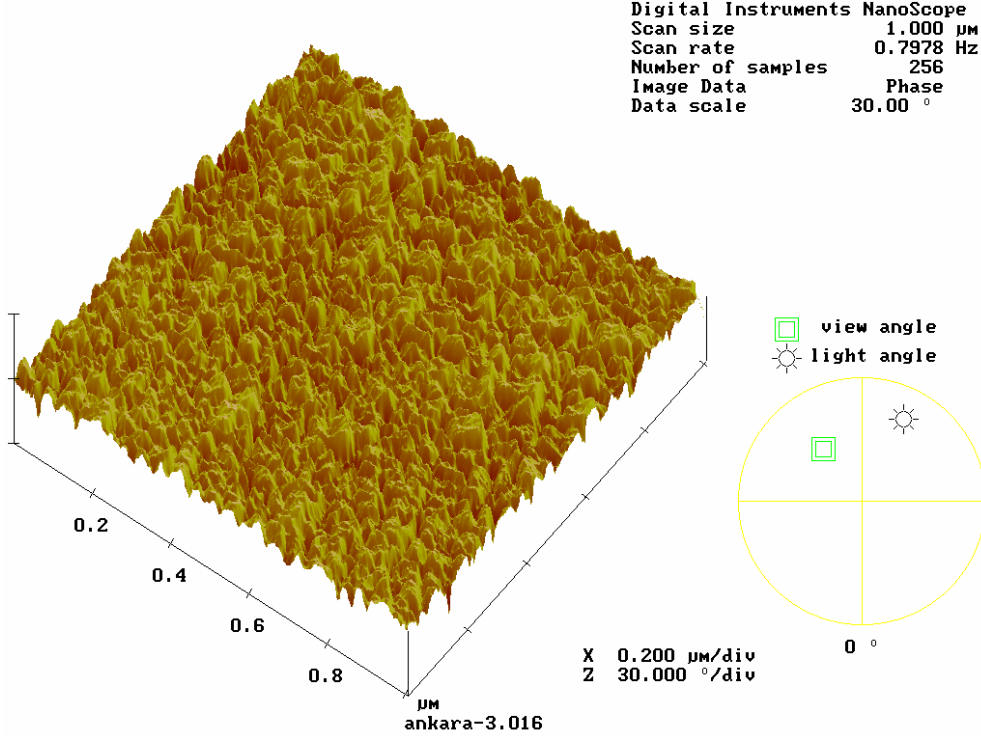
Farklı pH değerlerinde 0.01 M iyonik gerilim ve  $Co=1.5$  g/L BSA ile kirlenmiş 10 kDa PES membranların AFM analizleri yaptırılmış ve temiz membran ile karşılaştırılmıştır (Şekil 5.37-5.40). Üç boyutlu AFM görüntülerinden membran yüzey yapısındaki değişimin pH=3.78’de en fazla, pH=4.78’de en az olduğu görülmektedir.



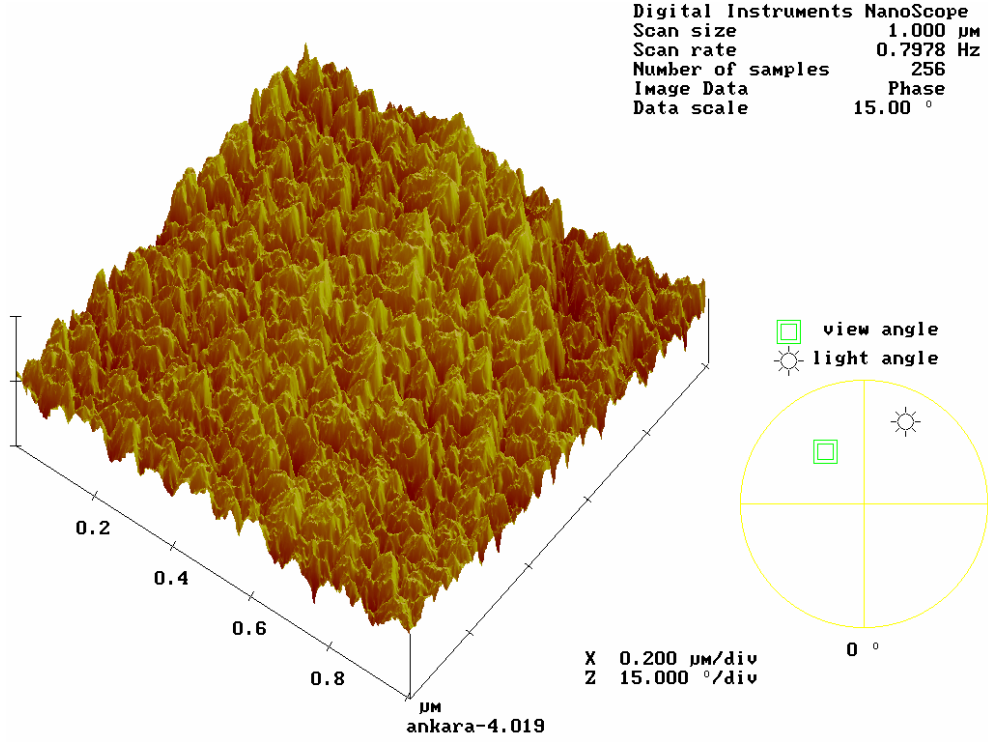
Şekil 5.37. 10 kDa temiz PES membran AFM görüntüsü



Şekil 5.38. pH=3.78, I=0.01 M ve Co=1.5 g/L BSA ile kirlenmiş 10 kDa PES membranının AFM görüntüsü



Şekil 5.39. pH=4.78, I=0.01 M, Co=1.5 g/L BSA ile kirlenmiş 10 kDa PES membranının AFM görüntüsü



Şekil 5.40. pH=6.80, I=0.01 M ve Co=1.5 g/L BSA ile kirlenmiş 10 kDa PES membranının AFM görüntüsü

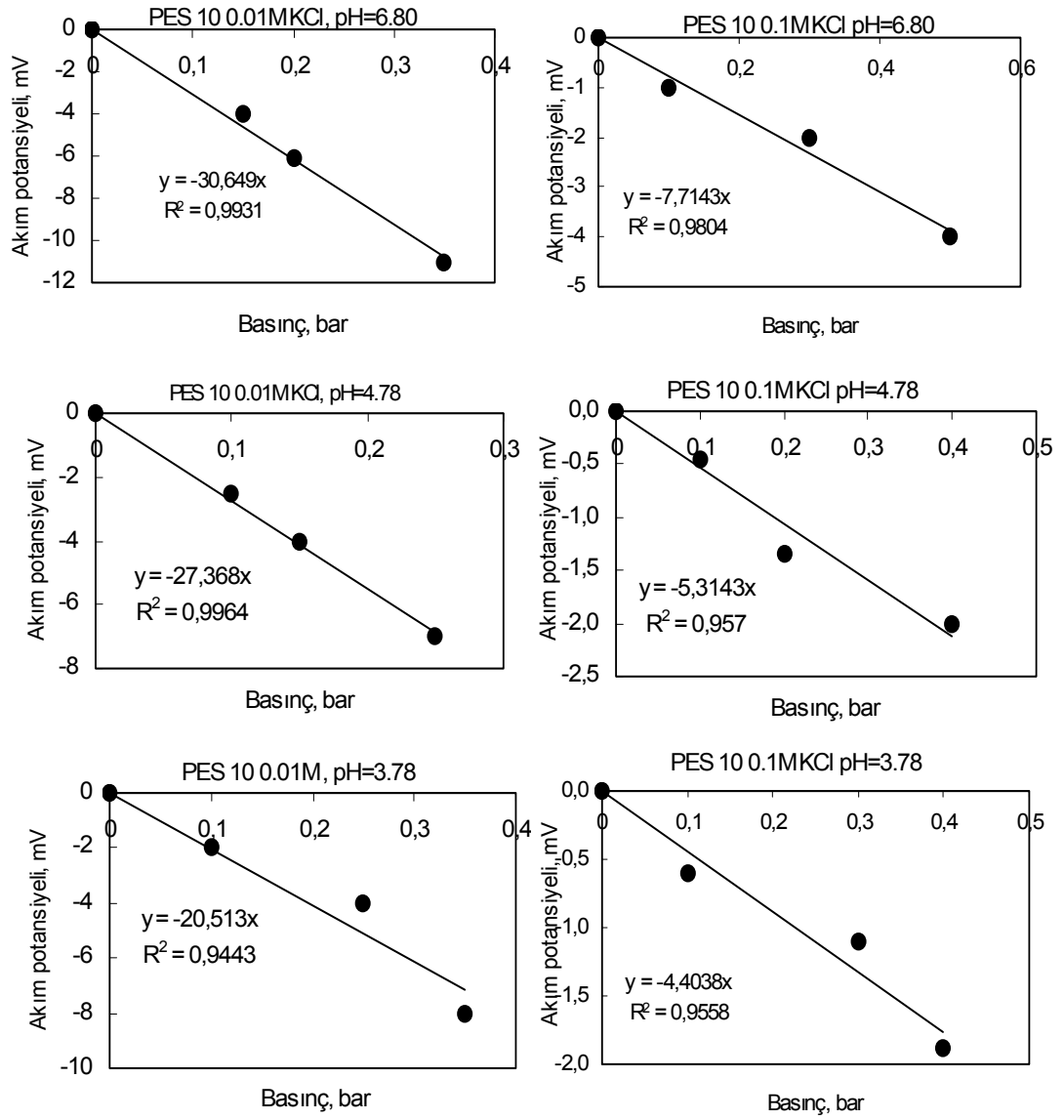
### 5.5. Elektrokinetik Ölçümler/ Hesaplamalar

BSA'nın PES ve CTA ultrafiltrasyon membranlara adsorpsiyonunda, protein ile membranlar arasındaki ara yüzey etkileşimlerinin önemini ortaya koymak ve farklı iyonik çevrelerde protein-membran etkileşim enerjilerinin büyüklüklerini hesaplamak amacıyla, membranların elektrostatik özellikleri deneysel olarak yüzey yüklerinin ölçülmesi ile proteinlerin yükleri ise teorik olarak belirlenmiştir.

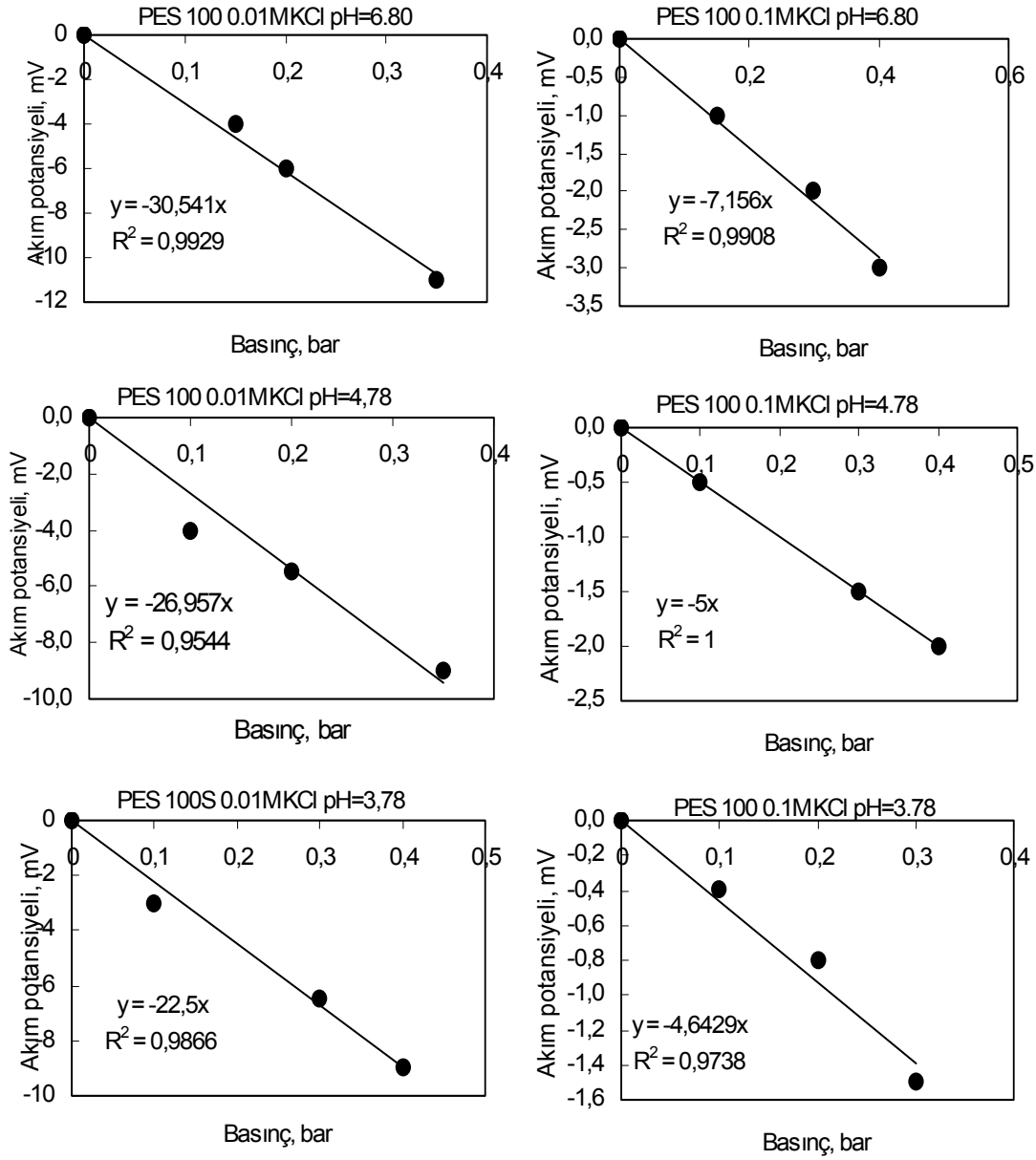
### 5.5.1. PES membranların yüzey yükleri/zeta potansiyelleri

10 ve 100 kDa PES membranlar için zeta potansiyelleri ( $\zeta$ ), Bölüm 4.2.2’de anlatıldığı gibi akım potansiyeli ölçüm yöntemi ile pH=3.78, 4.78, 6.80’de ve 0.01 M ve 0.1 M KCl çözeltileri ile sağlanan iyonik gerilim değerlerinde belirlenmiştir.

Membranların zeta potansiyellerinin belirlenmesi için farklı basınç değerlerinde ve çalışılan her iyonik çevre için (pH ve I) akım potansiyelleri deneysel olarak ölçülerek akım potansiyel katsayısı ( $dE/d\Delta P$ ) belirlenmiş (Şekil 5.41-5.42) ve bu değerler Helmholtz-Smoluchowski eşitliğinde (Eş.2.4) yerine konularak membran zeta potansiyelleri hesaplanmıştır. Çizelge 5.5’de farklı 10 ve 100 kDa PES membranlar için bulunan zeta potansiyelleri verilmiştir. Zeta potansiyellerinin hesaplanması için gerekli iletkenlik değerleri 0.01 M iyonik gerilim için  $\Lambda=0.1436$  S/m ve 0.1 M iyonik gerilim için 0.4532 S/m olarak ölçülmüştür.



Şekil 5.41. 10 kDa PES membranın 0.01M ve 0.1 M iyonik gerilim ve üç farklı pH değerlerinde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi



Şekil 5.42. 100 kDa PES membranın 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim ve üç farklı pH değerlerinde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi

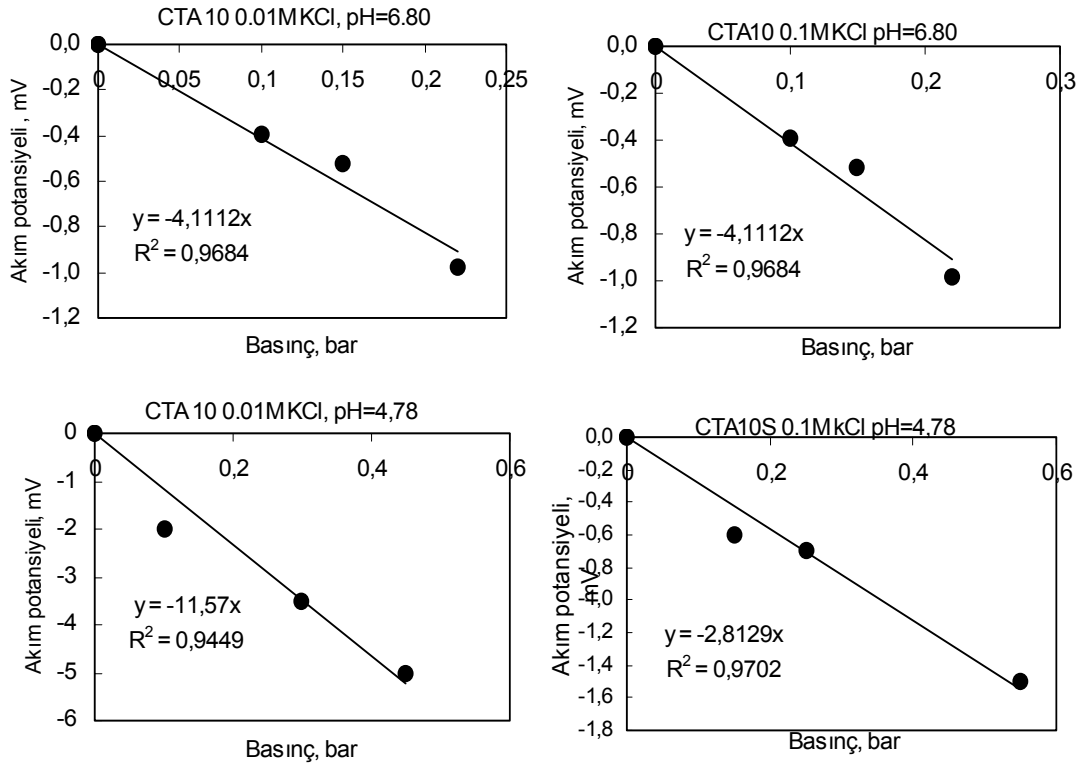
Çizelge 5.5. 10 ve 100 kDa PES membranların zeta potansiyellerinin iyonik çevre ile değişimi

pH	10 kDa PES		100 kDa PES	
	0.01M KCl ζ (mV)	0.1M KCl ζ (mV)	0.01M KCl ζ (mV)	0.1M KCl ζ (mV)
3.78	-34.40	-20.99	-36.84	-22.79
4.78	-43.66	-23.07	-42.30	-24.92
6.80	-48.33	-33.71	-48.33	-33.96

PES membranların çalışılan koşullarda negatif yüklü olmasının nedeni anyonlarının seçimli adsorpsiyonuna bağlanabilir. 10 ve 100 kDa PES membranların zeta potansiyellerinin nominal değerleri pH'ın artması ile artarken, iyonik gerilimin artması ile azalmıştır.

### 5.5.2. CTA membranların yüzey yükleri/zeta potansiyelleri

CTA membranların zeta potansiyellerinin hesaplaması için farklı basınç değerlerinde, pH=4.78 ve 6.80 ile 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim koşullarında akım potansiyelleri ölçülerek çizilen grafiklerden ( $E$ ,  $\Delta P$ ) akım potansiyeli katsayısı ( $dE/d\Delta P$ ) belirlenmiş (Şekil 5.43) ve bulunan değerler Helmholtz-Smoluchowski eşitliğinde (Eşit.2.4) yerine konularak zeta potansiyelleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.6). CTA membran zeta potansiyeli çalışılan tüm koşullarda anyonların tercihli adsorpsiyonundan dolayı -PES membranlar gibi- negatif yüklüdür. pH'ın artması ile zeta potansiyel nominal değerleri artmış, iyonik gerilimin artması ile de azalmıştır.



Şekil 5.43. 10 kDa CTA membranının 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim ve iki farklı pH değerlerinde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi

Çizelge 5.6. 10 kDa CTA membranların zeta potansiyellerinin iyonik çevre ile değişimi

pH	10 kDa CTA	
	0.01M KCl ζ (mV)	0.1M KCl ζ (mV)
4.78	-18.20	-13.65
6.80	-25.9	-19.83

### 5.5.3. Proteinlerin zeta potansiyelleri : BSA

BSA'nın net yükünün teorik olarak belirlenebilmesi için asit-baz dengesine dayalı olarak türetilmiş olan Handerson-Hasselbach eşitliği (Eş.2.7) kullanılmıştır. Net yük değerinden proteinin zeta potansiyeline geçmek için ise Poisson-Boltzmann eşitliğinden (Eş. 2.8) yararlanılmıştır. Bu eşitlikte hesaplamalar için gerekli protein yarıçapı  $r=3\text{nm}$  alınmış, çift tabaka kalınlıkları (Eş.2.6) 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilim değerleri için sırası ile  $\kappa^{-1}=3.07 \times 10^{-9}\text{m}$  ve  $9.69 \times 10^{-10}\text{m}$  olarak bulunmuştur.

Bir proteinin net yük değerinin hesaplanabilmesi için amino asit bileşimine ve yapıdaki iyonlaşabilen amino asitlerin ayrışma sabitlerine ihtiyaç vardır. BSA için Çizelge 4.1'de verilen amino asit bileşimi ve Çizelge 2.8'de yer alan ayrışma sabitleri kullanılarak farklı pH ve iyonik gerilimlerdeki net yük değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 5.7'de gösterilmiştir.

BSA'nın zeta potansiyeli,  $\text{pH}=6.80$ 'de negatif (anyon formu),  $\text{pH}=3.78$ 'de pozitif (katyon formu) ve  $\text{pH}=4.78$ 'de de pozitif işaretlidir. İyonik gerilim değerinin artması ile proteinin zeta potansiyeli azalmıştır.

### 5.5.4. DLVO teorisi ile ara yüzey etkileşim enerjilerinin hesaplanması

Membran ve protein gibi yüklü iki yüzey arasında elektrostatik ve van der Waals ara yüzey etkileşim enerjilerinin kantitatif büyüklüğü BSA için Bölüm 2.4.1.3'de anlatılan DLVO teorisi ile hesaplanmış ve zeta potansiyelinin işaretine bağlı olarak pozitif veya negatif olarak elde edilmiştir.

Çizelge 5.7. BSA'nın net yükü ve zeta potansiyelinin pH ve iyonik gerilim ile değişimi

	pH=3.78	pI=4.78	pH=6.80
Net yük	44.67	0.136	-15.81
Zeta potansiyeli (mV)-0.01M	0.138	$4.20 \times 10^{-4}$	-0.049
Zeta potansiyeli (mV)-0.1M	0.067	$2.03 \times 10^{-4}$	-0.024

Elektrostatik etkileşim enerjisinin ( $E_e$ ) hesaplanmasında kullanılan Eş.2.9'da yer alan membranlara ait zeta potansiyellerinin ( $\zeta_1$ ) pH ve iyonik gerilim ile değişimi Çizelge 5.5 ve Çizelge 5.6'da; BSA'nın farklı iyonik gerilim ve pH değerlerinde zeta potansiyelleri ( $\zeta_2$ ) ise Çizelge 5.7'de verilmiştir. BSA'nın yarıçapı ile farklı iyonik gerilim değerleri için çift tabaka kalınlıklarının ( $\kappa^{-1}$ ) değeri Bölüm 5.5.3'de verilmiştir. Membran ve protein arasındaki ayırma mesafesi (H),  $H \ll r$  olma koşulu, ve elektrostatik ve van der Waals etkileşimlerinin ortaya çıktığı mesafe dikkate alınarak  $1 \times 10^{-9}$ m olarak kabul edilmiştir. van der Waals etkileşim enerjisinin ( $E_w$ ) (Eş.2.10) hesaplanması için gerekli olan Hamaker sabiti (A) ise, PES ve CTA membranlar için sırası ile  $A_{PES}=1.86kT$  ve  $A_{CTA}=0.86kT$  (Zydney ve Pujar 1998) olarak alınmıştır. Burada k; Boltzmann sabiti ( $1.38 \times 10^{-23}$  J/K) T; mutlak sıcaklıktır.

DLVO teorisine göre elektrostatik ve van der Waals etkileşimlerinin toplamı, adsorpsiyonla sonuçlanan itme veya çekme olaylarını belirler. Çekme olduğu durumda bu toplamın işareti negatif; itme kuvvetlerinin etkin olduğu durumda ise toplam enerji pozitifdir (Howell vd 1993). Çizelge 5.8-5.10'da farklı iyonik çevrelerde hesaplanan etkileşim enerjileri yer almaktadır. BSA'nın izoelektrik noktasında (pH=4.78), PES ve CTA membranlar ile elektrostatik ve van der Waals etkileşim enerjilerinin toplamı en az iken, pH=3.78'de çekme kuvvetleri en fazladır. İzoelektrik noktanın üzerinde (pH=6.80) ise itme kuvvetleri baskın olmasına rağmen adsorpsiyon gerçekleşmiştir. İyonik gerilimin atması toplam etkileşim enerjisi azalmıştır.

Çizelge 5.8. BSA ve 10 kDa PES membran arasında elektrostatik, van der Waals ve toplam etkileşim enerjileri

pH	Ee (J)		Ew(J)	Toplam enerji (J; DLVO teori)	
	0.01M KCl	0.1M KCl		0.01 M KCl	0.1 M KCl
3.78	$-1.16 \times 10^{-19}$	$-6.63 \times 10^{-21}$		$-1.17 \times 10^{-19}$ çekme	$-7.52 \times 10^{-21}$ çekme
4.78	$-6.04 \times 10^{-21}$	$-6.63 \times 10^{-22}$	$-8.86 \times 10^{-22}$	$-6.93 \times 10^{-21}$ çekme	$-1.56 \times 10^{-21}$ çekme
6.80	$1.26 \times 10^{-20}$	$3.28 \times 10^{-21}$		$1.17 \times 10^{-20}$ itme	$2.39 \times 10^{-21}$ itme

Çizelge 5.9. BSA ve 10 kDa CTA membran arasında elektrostatik, van der Waals ve toplam etkileşim enerjileri

pH	Ee (J)		Ew(J)	Toplam enerji (J; DLVO teori)	
	0.01M KCl	0.1 M KCl		0.01 M KCl	0.1 M KCl
4.78	$-4.48 \times 10^{-22}$	$-2.43 \times 10^{-22}$		$-2.45 \times 10^{-21}$ çekme	$-2.24 \times 10^{-21}$ çekme
6.80	$4.89 \times 10^{-21}$	$2.02 \times 10^{-21}$	$-2.00 \times 10^{-21}$	$2.89 \times 10^{-21}$ itme	$0.2 \times 10^{-22}$ itme

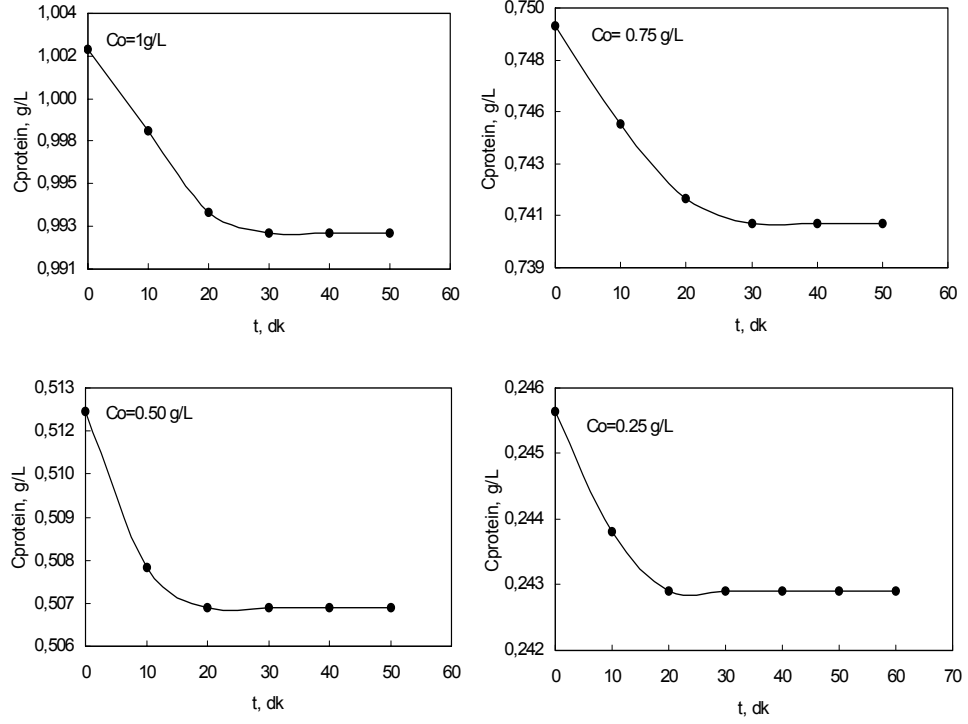
Çizelge 5.10. BSA ve 100 kDa PES membran arasında elektrostatik, van der Waals ve toplam etkileşim enerjileri

pH	Ee (J)		Ew(J)	Toplam enerji (J; DLVO teori)	
	0.01M KCl	0.1M KCl		0.01 M KCl	0.1 M KCl
3.78	$-1.21 \times 10^{-19}$	$-6.82 \times 10^{-21}$		$-1.22 \times 10^{-19}$ çekme	$-7.70 \times 10^{-21}$ çekme
4.78	$-5.99 \times 10^{-21}$	$-6.98 \times 10^{-22}$	$-8.86 \times 10^{-22}$	$-6.88 \times 10^{-21}$ çekme	$-1.58 \times 10^{-21}$ çekme
6.80	$1.26 \times 10^{-20}$	$3.28 \times 10^{-21}$		$1.17 \times 10^{-20}$ itme	$2.39 \times 10^{-21}$ itme

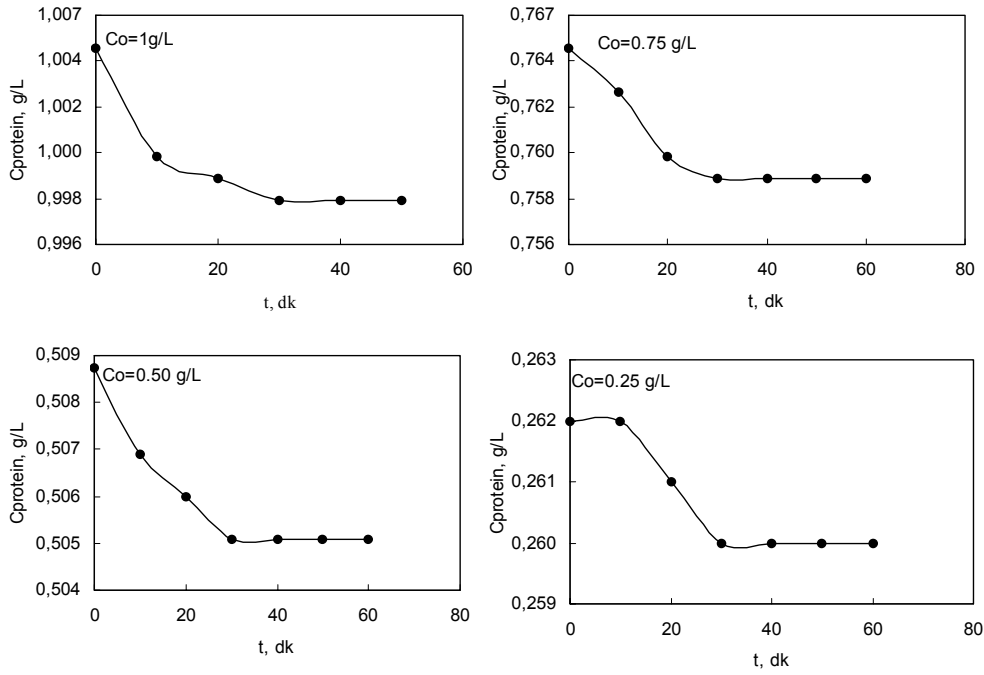
## 5.6. SAP'ın 100 kDa PES Membranlara Adsorpsiyonu

### 5.6.1. pH etkisi

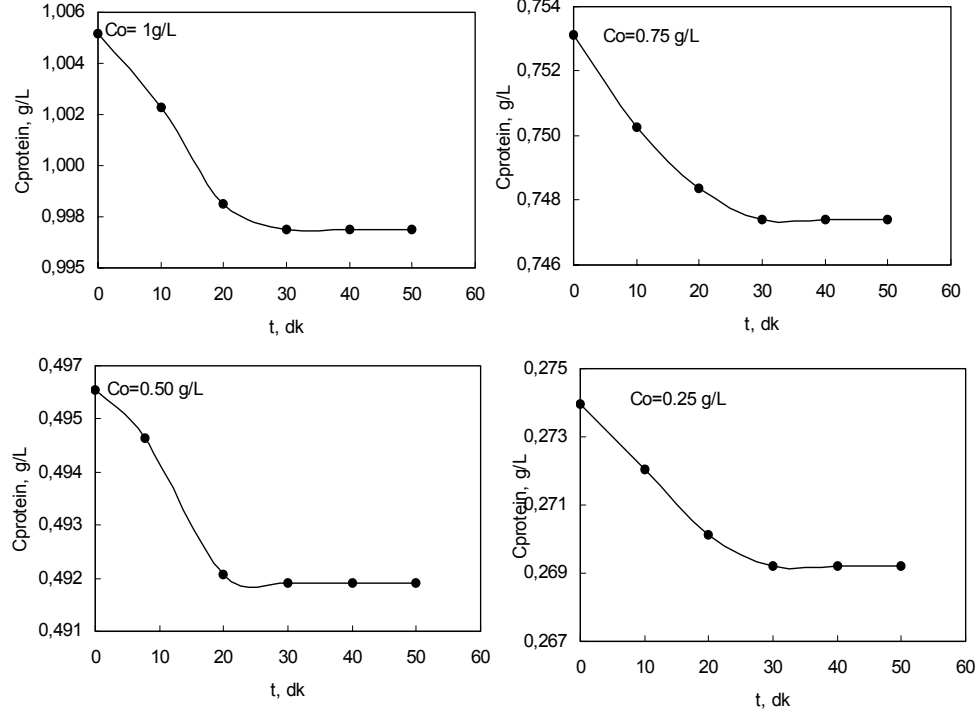
SAP enziminin (MA=27.5 kDa) 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonu  $C_0=0.25$ , 0.50, 0.75 ve 1 g/L başlangıç derişimlerinde, enzimin üretim ortamında kullanılan 0.04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  fosfat tamponu ile sağlanan izoelektrik noktasının altında (pH=7.14), izoelektrik noktasında (pI=9.08) ve izoelektrik noktasının üzerindeki (pH=11.06) farklı üç pH değerinde incelenmiştir. Farklı zamanlarda sıvı fazdan alınan örneklerde protein derişimleri analizlenerek yaklaşık 30 dakika içinde denge değerlerine ulaşıldığı görülmüş (Şekil 5.44-5.46) ve sıvı faz denge derişimlerine karşı membranlara adsorplanan enzim miktarının grafiğe geçirilmesi ile denge izotermi oluşturulmuştur (Şekil 5.47). Proteaz enzimi, hidrofobik yapıdaki PES membranlara lineer adsorpsiyon izotermine uygun olarak adsorplanmaktadır. Elde edilen denge izoterm denklemleri Çizelge 5.11'de verilmiştir. pH=7.40'da enzim adsorpsiyonu en fazla, pH=9.08'da (pI) ise en az olmuştur. pH=11.06'da yaklaşık 0.5 g/L enzim çözelti denge derişimine kadar izoelektrik nokta ile aynı miktarlarda adsorpsiyon gözlenmiş; bu değer üzerinde ise pH=7.40'dakinden daha az, ancak izoelektrik noktaya göre daha fazla adsorpsiyon gözlenmiştir (Şekil 5.47).



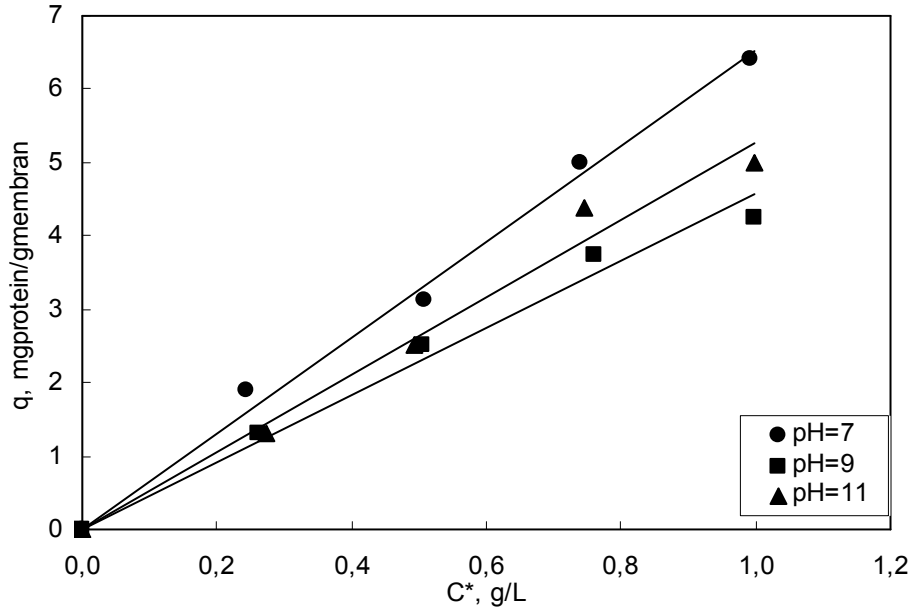
Şekil 5.44. SAP'ın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=7.14 ve 0.04 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz enzim derişiminin zamanla değışimi



Şekil 5.45. SAP'ın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=9.08 ve 0.04 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi



Şekil 5.46. SAP'ın 100 kDa PES membranlara statik adsorpsiyonunda farklı başlangıç derişimlerinde, pH=11.06 ve 0.04 M iyonik gerilim değerlerinde sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi



Şekil 5.47. SAP'ın 100 kDa PES membranlara farklı pH değerlerinde adsorpsiyon izotermi

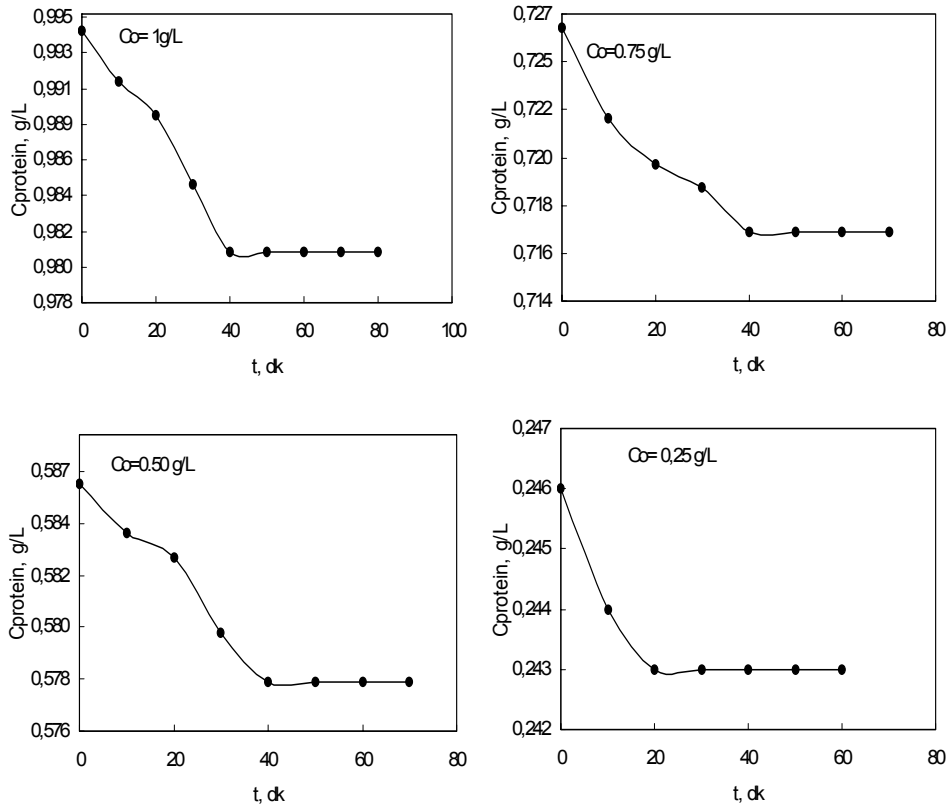
Çizelge 5.11. SAP'ın farklı pH değerlerinde 100 kDa PES membranlara adsorpsiyon denge izoterm denklemleri

pH	İzoterm denklemleri	R <sup>2</sup>
7.14	$q=6.54C^*$	0.99
9.08	$q=4.59C^*$	0.98
11.06	$q=5.27C^*$	0.98

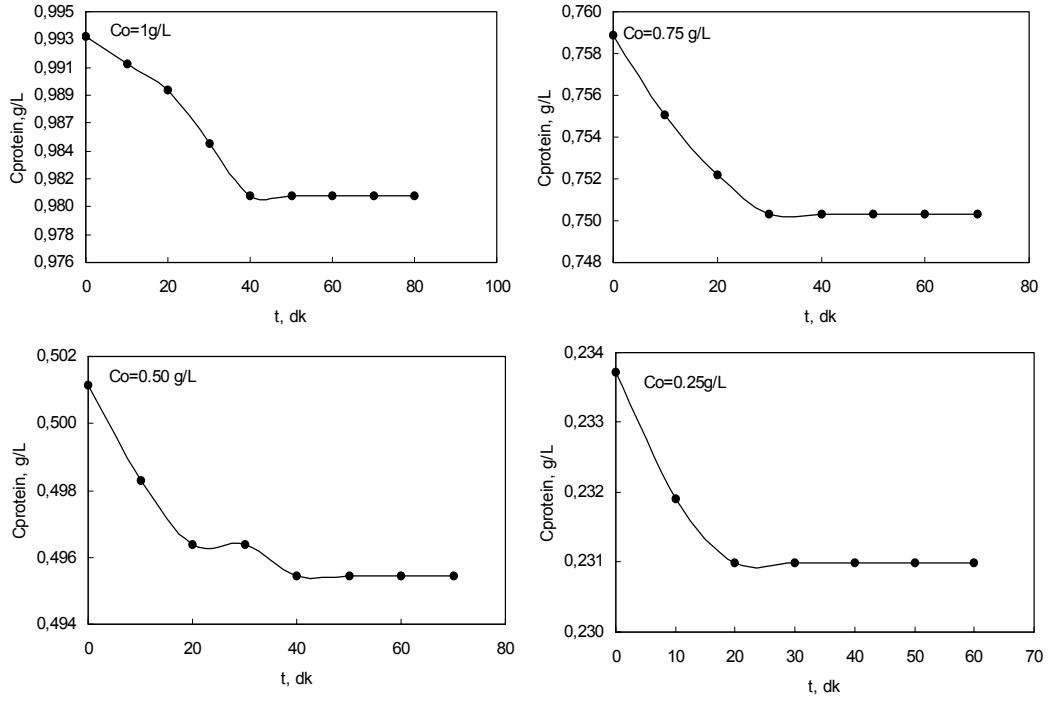
### 5.6.2. İyonik çevre etkisi

SAP enzimi ile PES membran arasında farklı iyonların varlığındaki ara yüzey etkileşimlerinin neden olduğu kirliliği incelemek amacıyla, enzim üretim ortamında bulunan iyonlar kullanılarak statik adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla fermentasyon ortamında bulunan iyonların ayrı ayrı ve birlikte etkisi, iyonik çevre açısından fermentasyon ortamına benzer sentetik bir ortam yaratılarak incelenmiş ve her

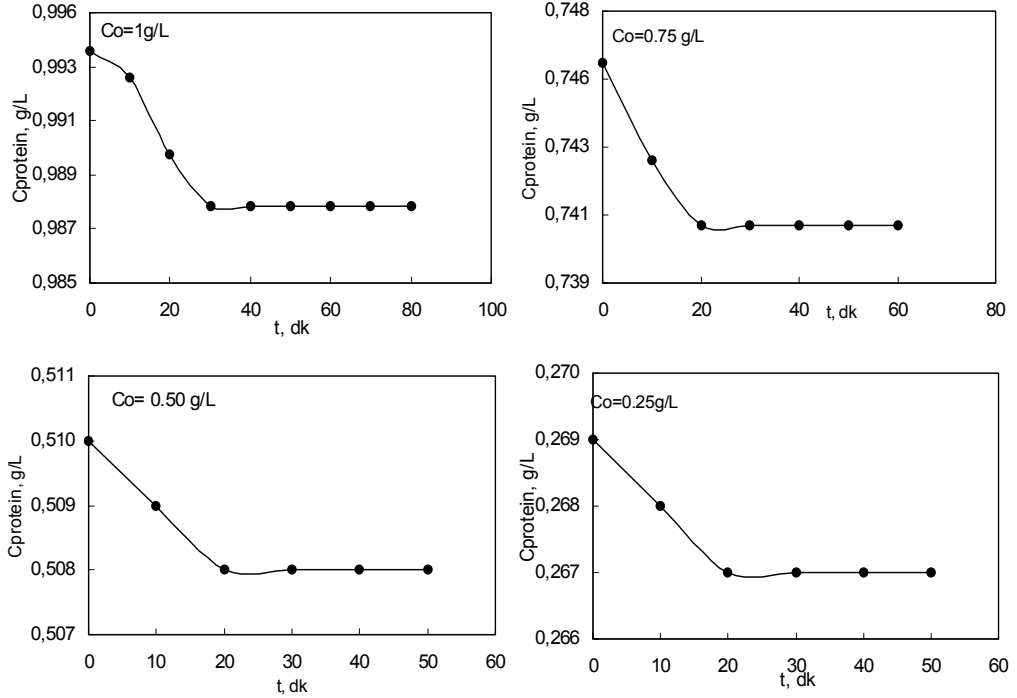
bileşenin enzim adsorpsiyonuna ve dolayısıyla membran kirliliğine etkisi bulunmuştur. Üretim pH'ı olan ve SAP enziminin izoelektrik noktasının altında bir değer olan pH=7.14 değerinde 0.04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  tamponuna, derişimleri Çizelge 4.3'de verilen bileşenler ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ) tek tek ve birlikte eklenerek enzimin  $C_0=0.25$ , 0.5, 0.75 ve 1 g/L başlangıç SAP derişimlerinde PES membranlara adsorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Sıvı faz enzim derişimlerinin zamanla değışimleri Şekil 5.48-5.51'de verilmiştir. Bu verilerden yararlanarak oluşturulan adsorpsiyon izotermeleri ise Şekil 5.52'de yer almaktadır. Her iyonun varlığında elde edilen adsorpsiyon izotermeleri lineer izoterm uymaktadır; izoterm denklemleri ise Çizelge 5.12'de verilmiştir.



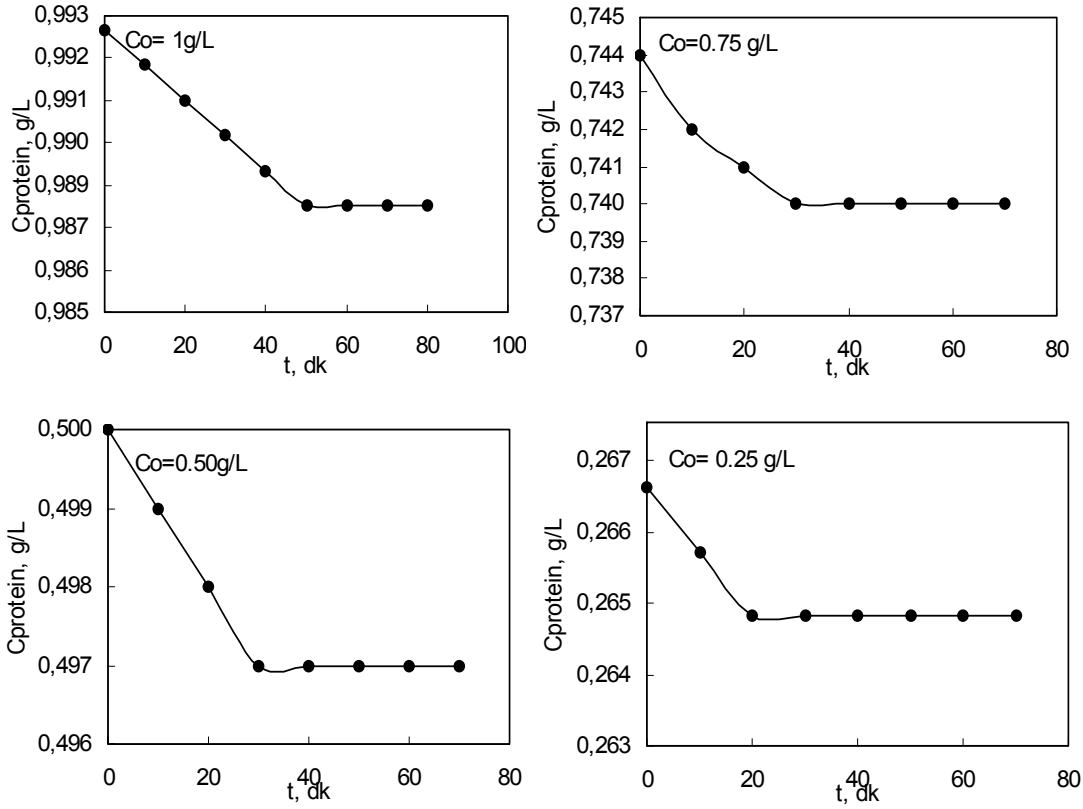
Şekil 5.48. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve 0.04 M fosfat tamponu +  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ortamında 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzimderişiminin zamanla değışimi



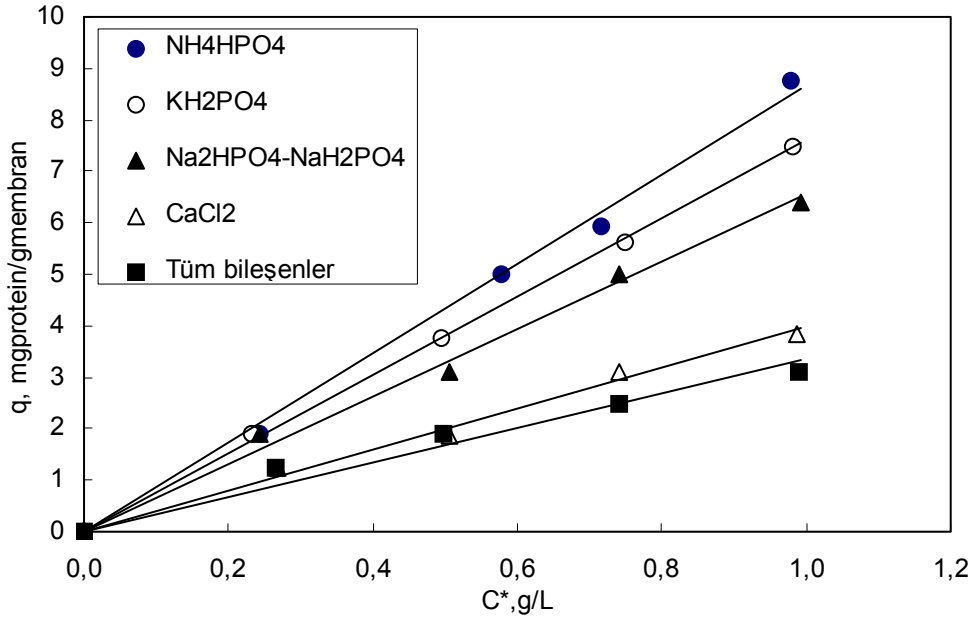
Şekil 5.49. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve 0.04 M fosfat tamponu +  $KH_2PO_4$  ortamında 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzim derişiminin zamanla değışimi



Şekil 5.50. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve 0.04 M fosfat tamponu +  $CaCl_2$  ortamında 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzim derişiminin zamanla değışimi



Şekil 5.51. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve 0.04 M fosfat tamponu +  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{CaCl}_2$  ortamında 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi



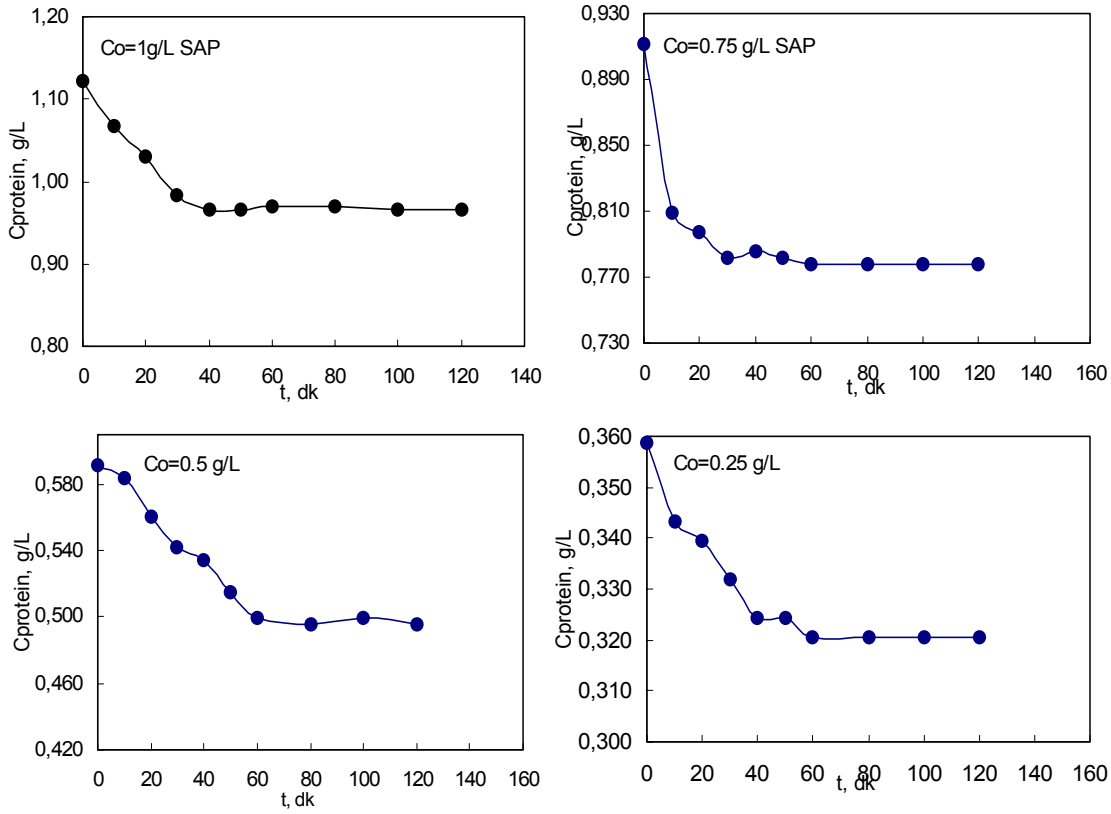
Şekil 5.52. SAP'ın 100 kDa PES membranlara üretim ortamındaki bileşenlerin varlığında adsorpsiyon izotermi

Çizelge 5.12. SAP üretim ortamı bileşenlerinin enzimin 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonunda elde edilen denge izoterm denklemleri

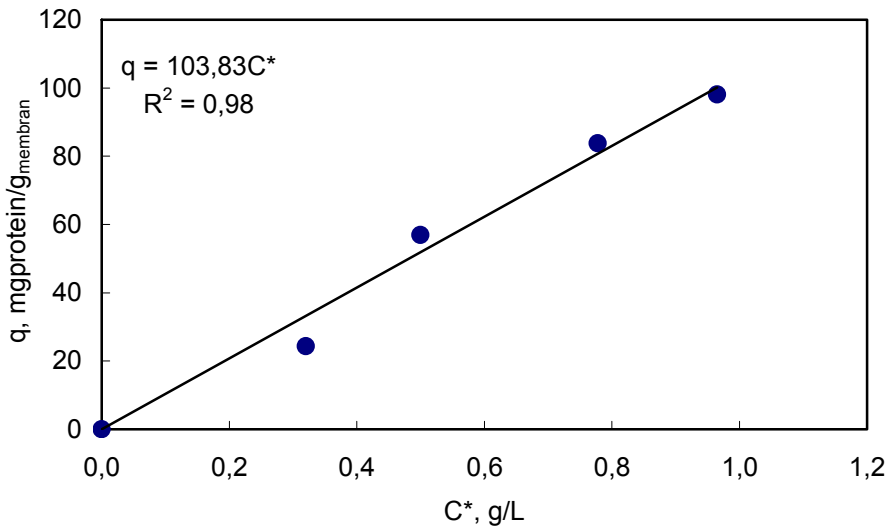
Bileşen	İzoterm denklemi	R <sup>2</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	q=8.66C*	0.99
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	q=7.61C*	0.99
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	q=6.54C*	0.99
CaCl <sub>2</sub>	q=3.98C*	0.99
Tüm bileşenler	q=3.36C*	0.96

SAP'ın PES membranlara adsorpsiyonu en yüksekten en düşüğe doğru sırası ile (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve tüm bileşenleri içeren çözeltilerde olmuştur. Fermentasyon ortam pH değeri (7.14) SAP'ın izoelektrik noktasının (pI=9) altında bir değer olduğu için, enzim her çözeltide pozitif yüklüdür. Ancak proteinin yük değeri ve hidrofob özelliği ortamın iyonik geriliminden etkileneyeceği için, iyonların ara yüzey etkileşimlerindeki rolü hem membran hem de protein üzerine olmaktadır. Her iyonun protein ve membranın yük değeri üzerine etkisi farklı olduğu için, SAP'ın üretim ortamı bileşenlerinin varlığında membranlara adsorpsiyonu farklılıklar göstermiştir.

Fermentasyon ile üretim ortamındaki iyonların SAP enziminin PES membranlara adsorpsiyonuna etkisi oluşturulan sentetik ortamlarda incelendikten sonra, gerçek fermentasyon ortamı verileri ile karşılaştırmak amacıyla *r-Bacillus licheniformis*'den üretilmiş olan SAP enziminin PES membranlara adsorpsiyonu Co=0.25-1 g/L SAP derişim aralığında ve üretim pH'ında (7.14) incelenmiştir. Sıvı faz enzim derişimlerinin zamanla değışimleri Şekil 5.53'de verilmiştir. Bu ortamdaki enzimin PES membranlara adsorpsiyonunun -sentetik ortamdakine benzer şekilde- lineer adsorpsiyon kinetiğine uyduğu belirlenmiştir (Şekil 5.54). Çizelge 4.3'de verilen üretim ortamındaki tüm bileşenlerin olduğu sentetik ve gerçek fermentasyon ortamlarındaki adsorpsiyon izotermi karşılaştırıldığında (Şekil 5.52 ve 5.54) fermentasyon ortamındaki enzimin daha fazla adsorplandığı; dolayısıyla daha fazla kirlilik yarattığı görülmektedir.



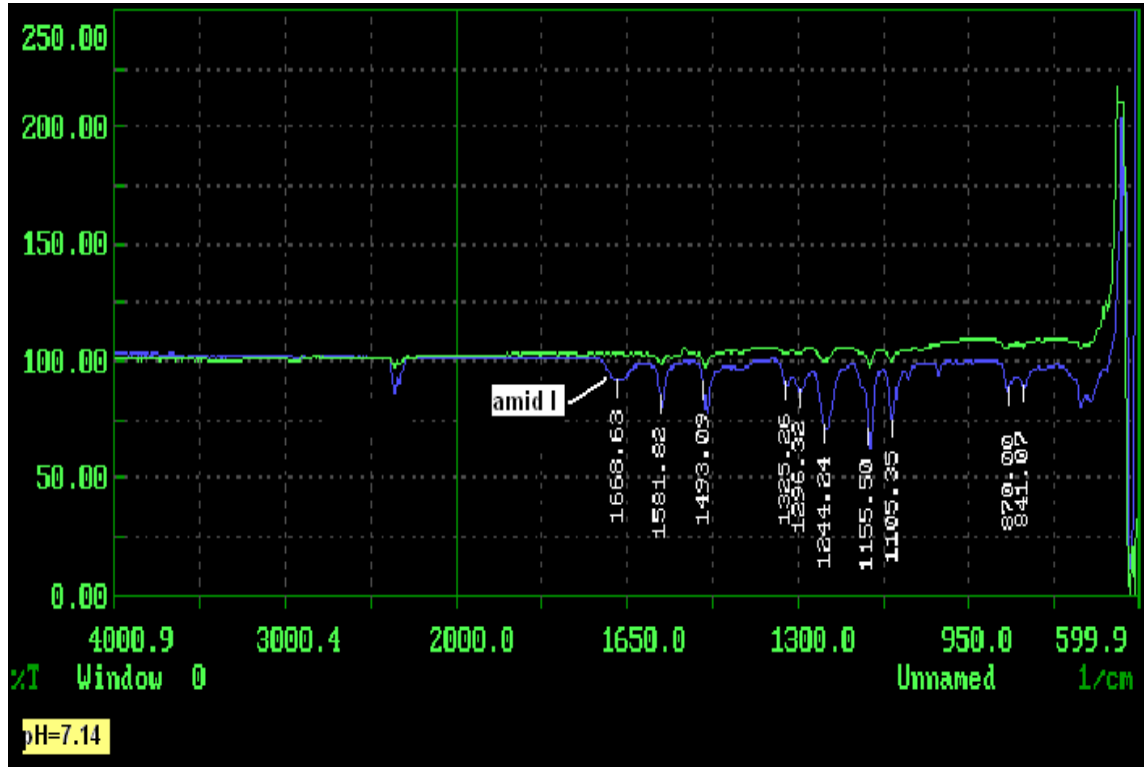
Şekil 5.53. Farklı başlangıç derişimlerinde pH=7.14 ve fermentasyon ile üretilen SAP'ın 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonda sıvı faz enzim derişiminin zamanla değişimi



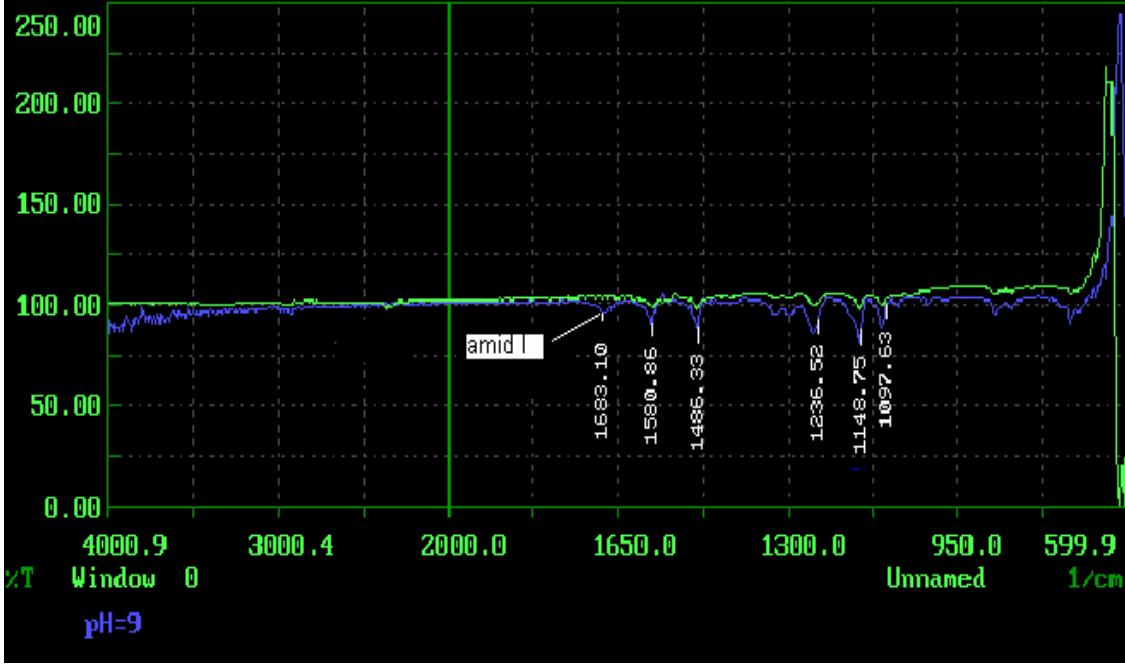
Şekil 5.54. Fermentasyon ile üretilen SAP enziminin 100 kDa PES membranlara adsorpsiyon izotermi

## 5.7. PES Membranların Yapısında SAP Adsorpsiyonu Sonucu Meydana Gelen Değişimler

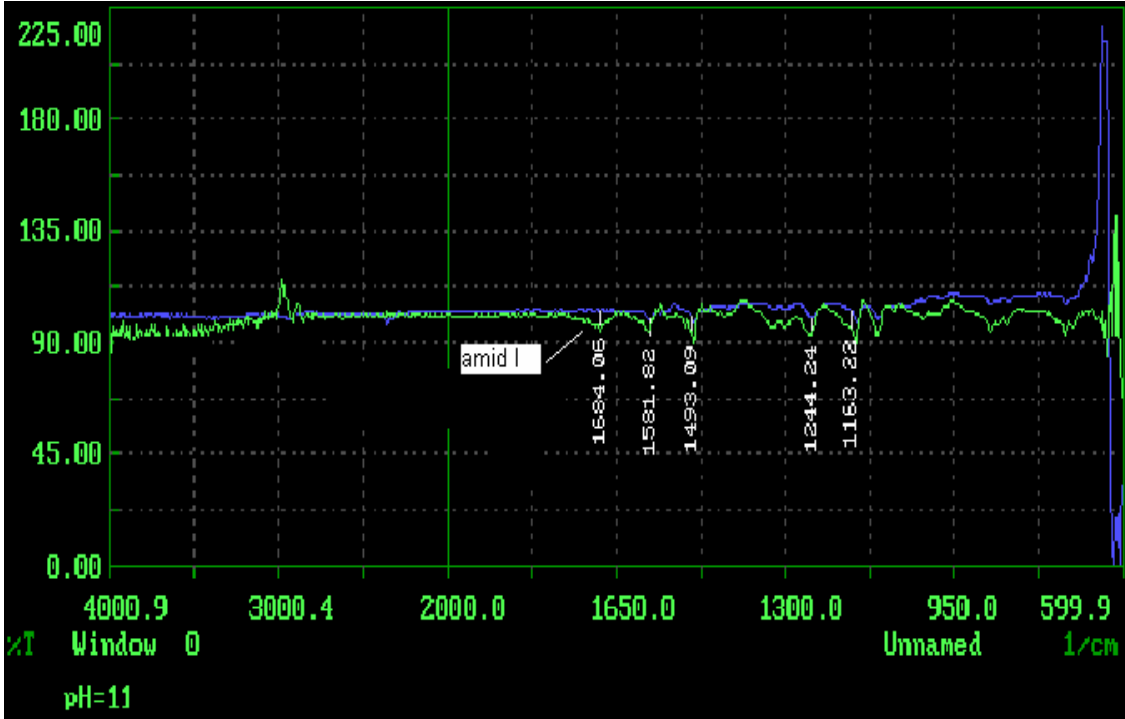
Proteaz enziminin üç ayrı pH değerindeki adsorpsiyonundan sonra PES membranların yüzeyi FTIR-ATR spektroskopisi ile analizlenerek yapıda meydana gelen değişimler incelenmiştir. Çalışılan tüm pH değerlerinde  $C_o=1$  g/L enzim adsorpsiyonu ile kirlenmiş olan 100 kDa PES membranlarda temiz membranın yapısından farklı olarak amid I bandı ( $1640-1670\text{ cm}^{-1}$ ; peptid bağı üzerinde bulunan C=O gerilmesinden kaynaklanan) gözlenmiştir (Şekil 5.55-5.57). Amid I bandının şiddeti izoelektrik noktanın altında (pH=7.14) diğer iki pH'a göre daha fazladır. pH=11.06'da gözlenen amid I pikinin şiddeti ise pH=9.08 değerinde gözlenenden daha fazladır.



Şekil 5.55.  $C_o=1$  g/L SAP derişiminde ve pH=7.14 koşullarında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu

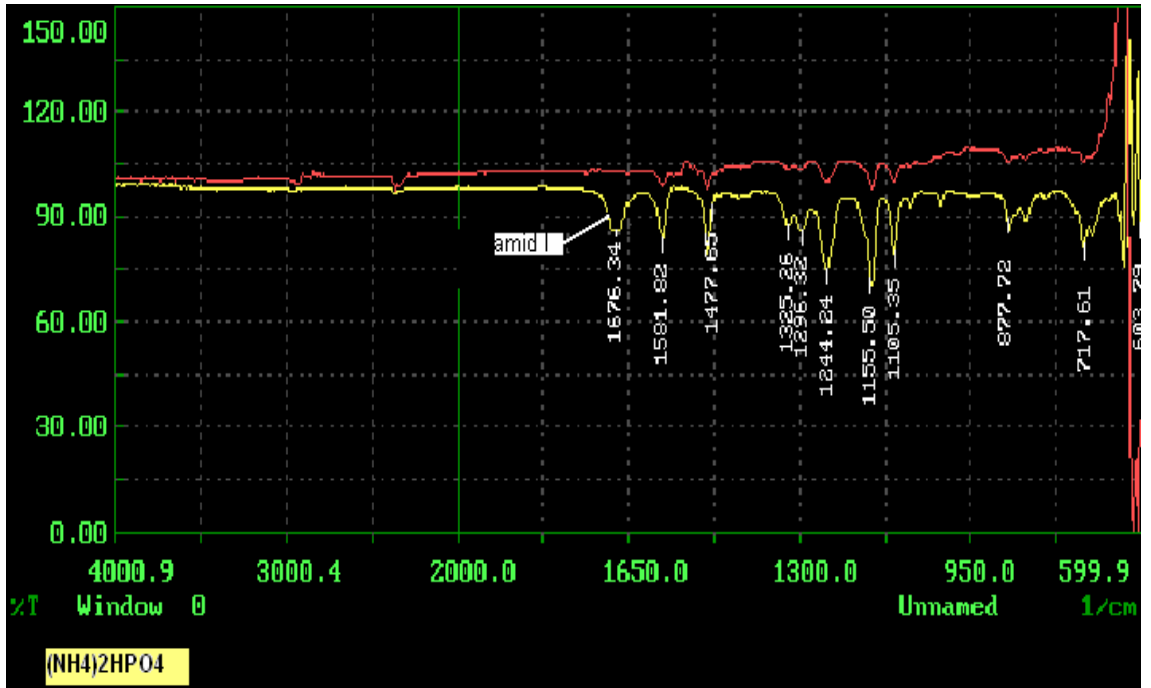


Şekil 5.56. Co=1 g/L SAP derişiminde ve pH=9.08 koşullarında temiz ve kirli PES membranının FTIR-ATR spektrumu

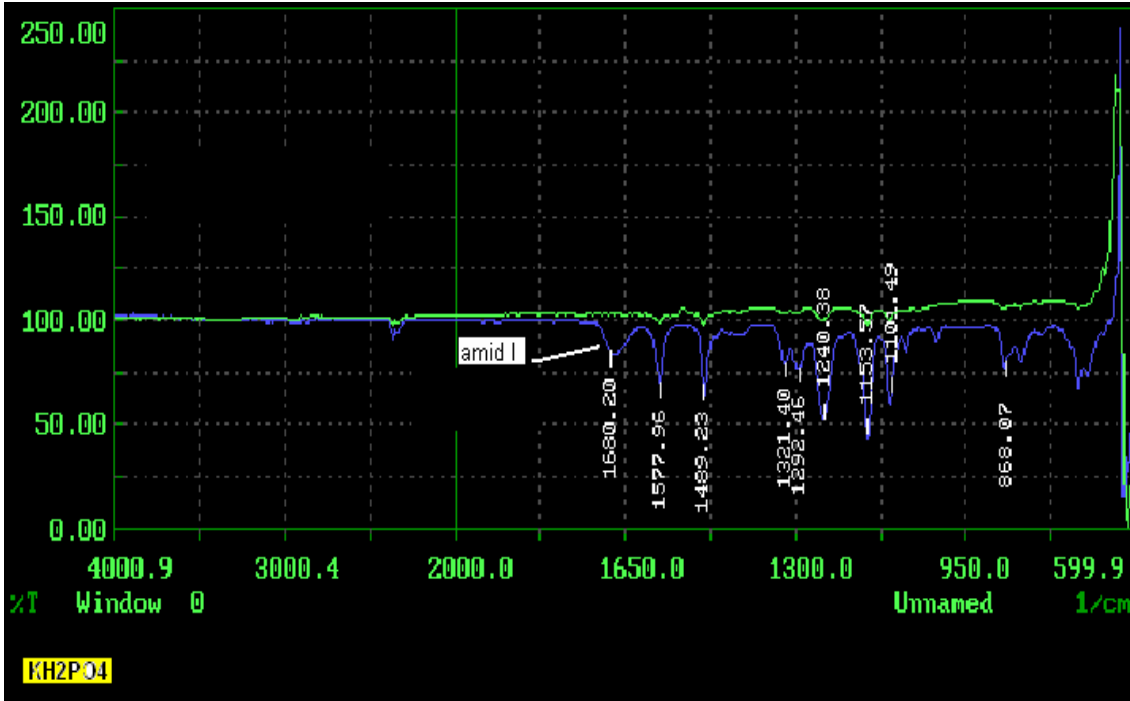


Şekil 5.57. Co=1 g/L SAP derişiminde ve pH=11.06 koşullarında temiz ve kirli PES membranının FTIR-ATR spektrumu

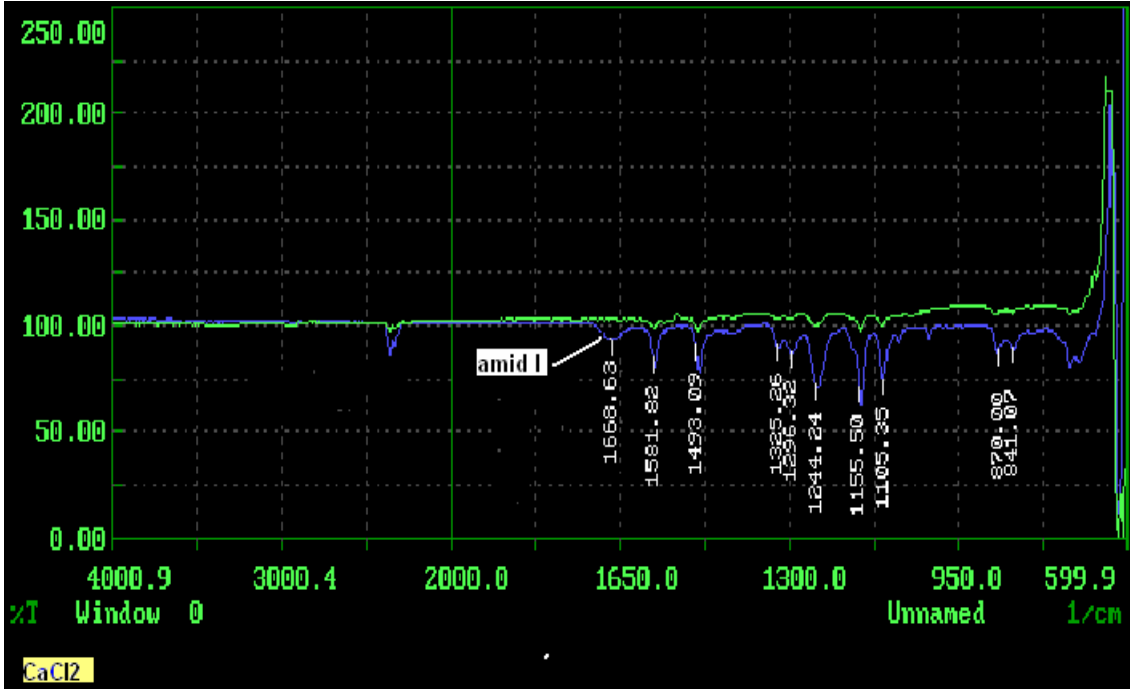
Sentetik olarak oluşturulan SAP enzim üretim ortamında bulunan iyonların, PES membranlara adsorpsiyonuna etkileri incelendikten sonra, bu iyonların varlığında kirlenen membranların yüzey yapısındaki değişimleri belirlemek amacıyla FTIR-ATR analizleri yapılmıştır. Her durumda membran yüzeyinde protein adsorpsiyonunun bir kanıtı olan  $1650\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı civarında amid I piki gözlenmiştir. Adsorpsiyonun fazla olduğu  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ortamında amid I pikinin şiddeti fazla, adsorpsiyonun sırası ile azaldığı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  ve tüm bileşenleri içeren çözeltilerde, amid I pikinin şiddeti gittikçe azalmıştır (Şekil 5.58- 5.61).



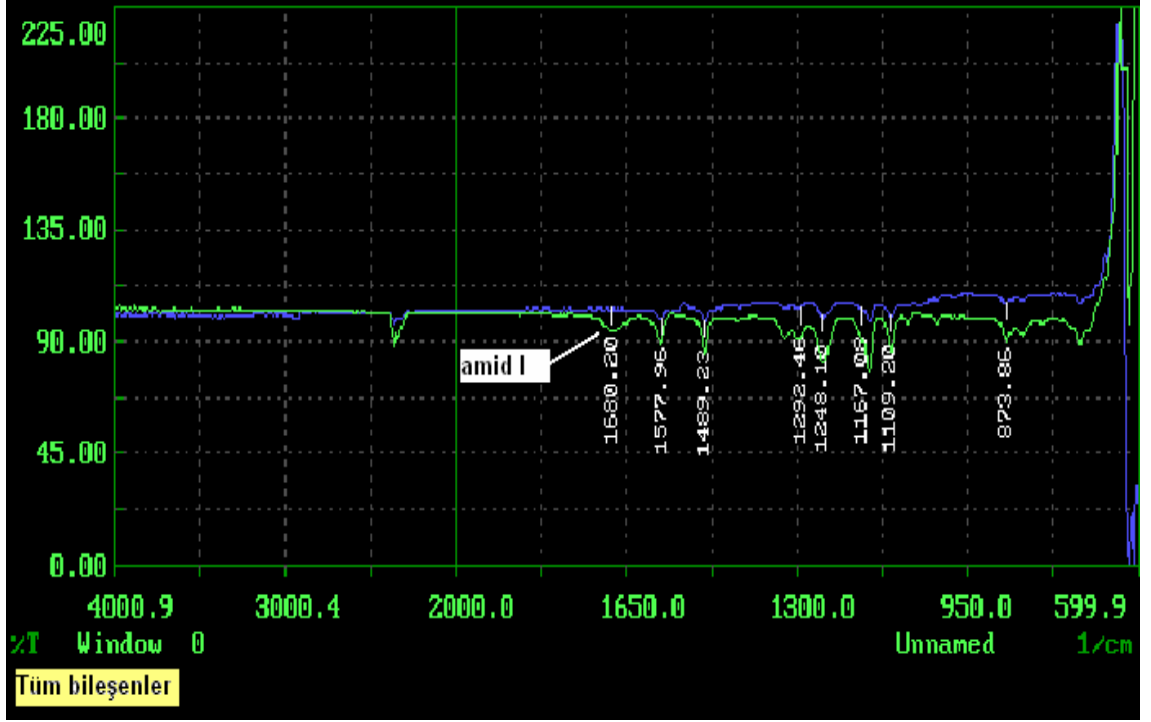
Şekil 5.58.  $\text{Co}=1$  g/L SAP derişiminde,  $\text{pH}=7.14$  ve  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ortamında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu



Şekil 5.59. Co=1 g/L SAP derişiminde, pH=7.14 ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ortamında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu



Şekil 5.60. Co=1 g/L SAP derişiminde, pH=7.14 ve CaCl<sub>2</sub> ortamında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu

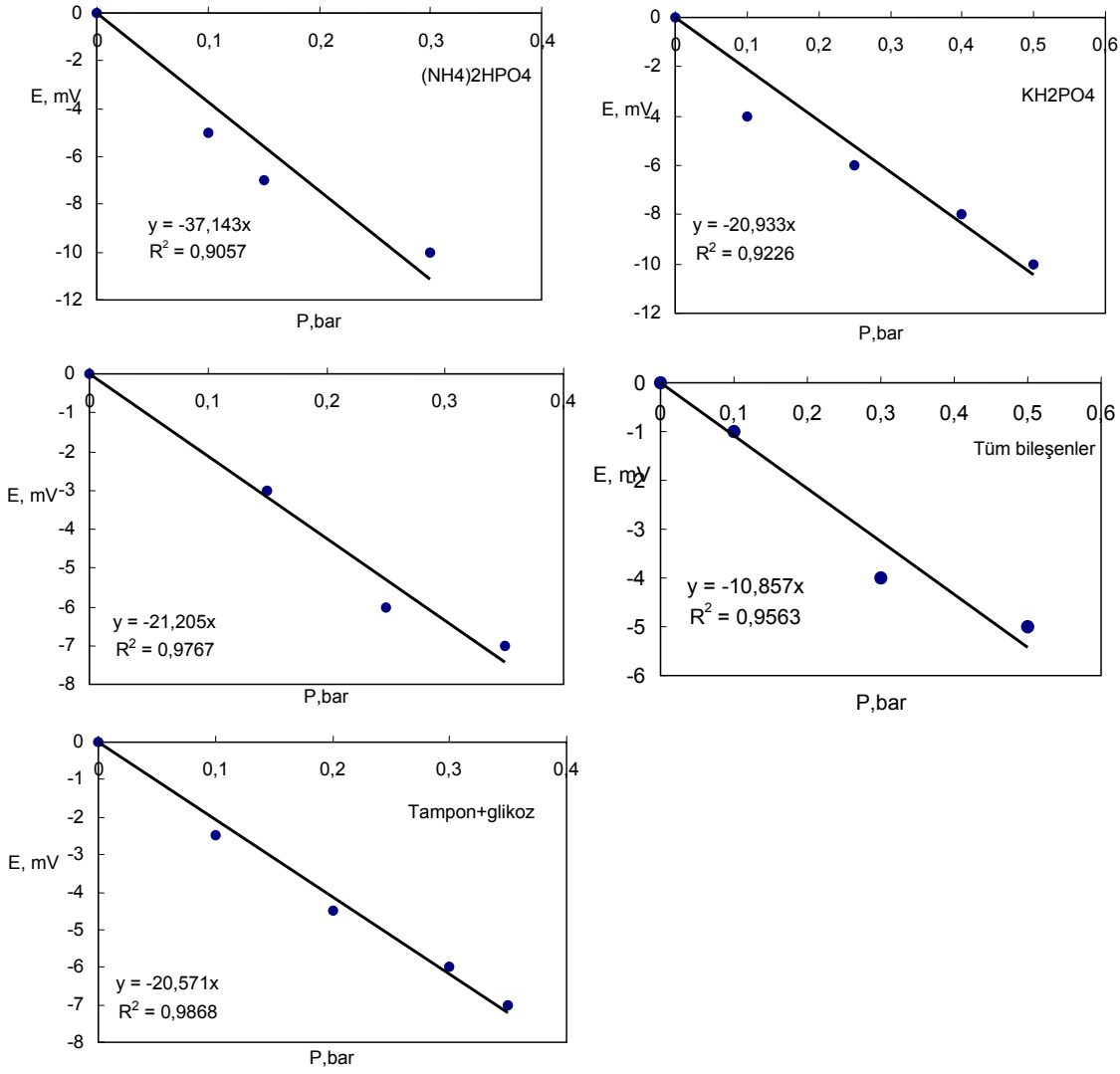


Şekil 5.61. Co=1 g/L SAP derişiminde, pH=7.14 ve  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{CaCl}_2$  ortamında temiz ve kirli PES membranın FTIR-ATR spektrumu

## 5.8. SAP Üretim Ortamındaki Bileşenlerin PES Membran Zeta Potansiyeline

### Etkisi

SAP üretim ortamında bulunan iyonların membran kirliliği üzerine etkilerini açıklamak amacıyla 100 kDa PES membranların zeta potansiyelleri, bu iyonların  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  ayrı ayrı ve hepsinin birlikte olduğu –adsorpsiyon deneylerinin yapıldığı koşullarda- farklı iyonik çevreler yaratılarak Bölüm 4.2.2’de anlatılan akım potansiyeli ölçüm yöntemine göre belirlenmiştir. Deneysel olarak bulunan akım potansiyeli katsayıları ( $dE/d\Delta P$ ) Şekil 5.62’de verilmiştir. Çizelge 5.13’de çözeltilerin iletkenlik değerleri ( $\Lambda$ ) ve iyonik gerilimleri (I); temiz ve adsorpsiyon sonucu kirlenmiş PES membranların hesaplanan zeta potansiyelleri ( $\zeta$ ) ve çift tabaka kalınlıkları ( $\kappa^{-1}$ ) yer almaktadır.



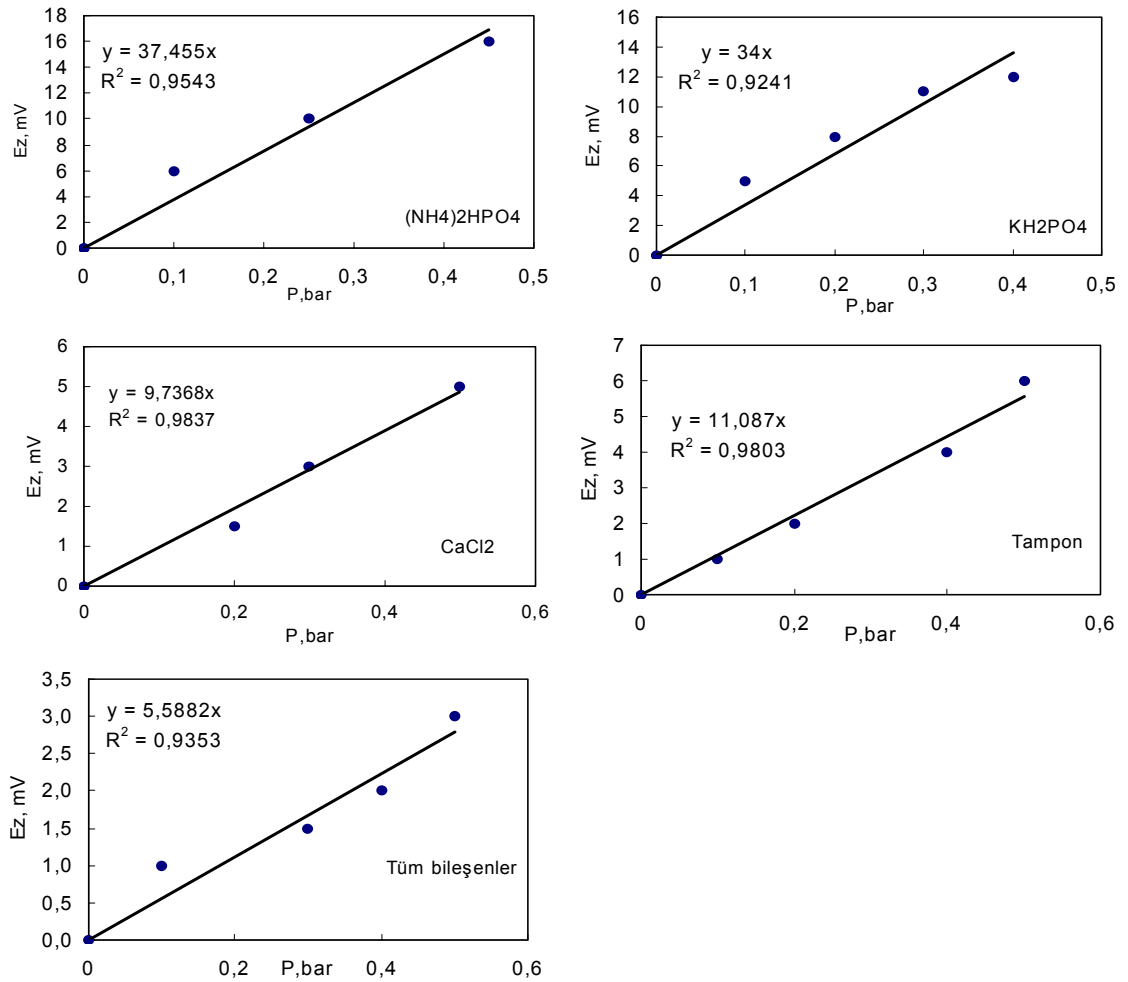
Şekil 5.62. 100 kDa temiz PES membranın farklı iyonik çevrelerde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi

Çizelge 5.13. İyonik çevrenin 100 kDa PES membranların elektrokinetik özellikleri üzerine etkileri

Bileşen	$\Lambda, \mu\text{S/cm}$	I, M	$\zeta_{\text{temiz}}, \text{V}$	$\zeta_{\text{kirli}}, \text{V}$	$\kappa^{-1}, \text{m}$
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6443	0.434	-0.308	0.311	$1.45 \times 10^{-8}$
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5412	0.263	-0.146	0.237	$1.87 \times 10^{-8}$
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4890	0.218	-0.138	0.070	$2.06 \times 10^{-8}$
CaCl <sub>2</sub>	4717	0.224	-0.129	0.062	$2.03 \times 10^{-8}$
Tüm bileşenler	6935	0.484	-0.097	0.050	$1.38 \times 10^{-8}$

Çizelge 5.13’de görüldüğü gibi protein adsorpsiyonundan önce, her çözeltide anyonların tercihli adsorpsiyonu nedeniyle membranlar negatif zeta potansiyeli kazanmışlardır.  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  içeren ortamda zeta potansiyelinin nominal değeri en yüksek iken sırası ile  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  ve bileşenlerin tümünü içeren ortamlarda azalmıştır.

Enzim ile kirlendikten sonra membranların zeta potansiyelleri, aynı tuz çözeltileri kullanarak tekrar ölçülmüş ve akım potansiyellerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir (Şekil 5.63). Membranların zeta potansiyellerindeki işaret değişimi, membran yüzeyine pozitif yüklü enzimin adsorplandığını göstermektedir (Çizelge 5.13)



Şekil 5.63. 100 kDa kirlı PES membranının farklı iyonik çevrelerde akım potansiyellerinin basınç ile değişimi

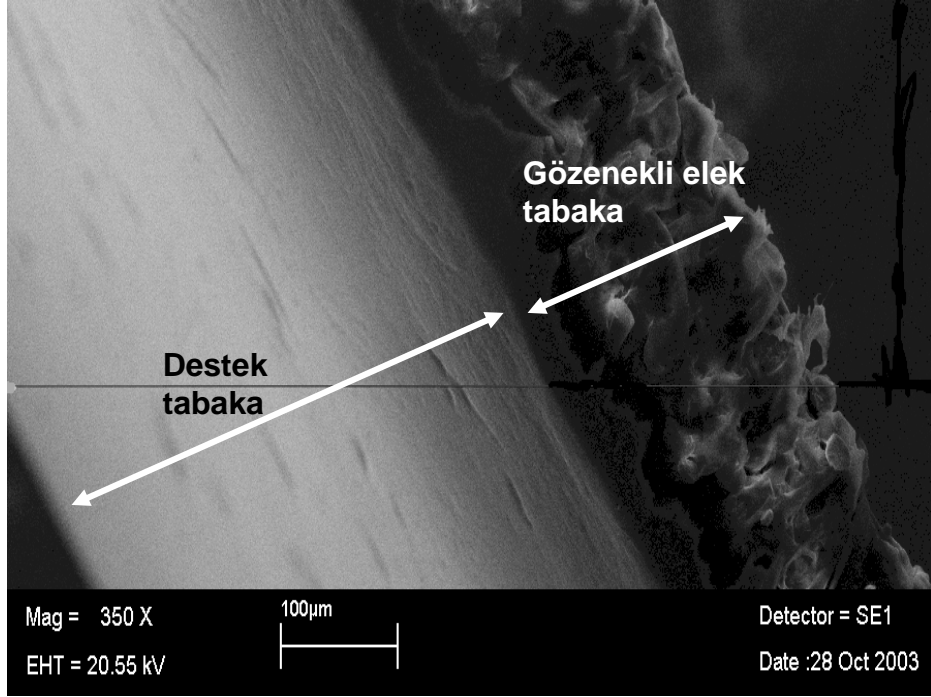
## 5.9. BSA ve SAP'ın 100 kDa PES Membranlarda Etkin Difüzyon Katsayıları

### 5.9.1. BSA etkin difüzyon katsayısının iyonik çevre ile değişimi

Model protein BSA'nın üç farklı pH (3.78, 4.78 ve 6.80) ve iki farklı iyonik gerilim (0.1 M ve 0.01 M) değerlerinde, lineer adsorpsiyon kinetiği gösterdiği  $C_0=0.5$  g/L başlangıç derişiminde deneyler yapılarak, 100 kDa PES membranlardaki etkin difüzyon katsayıları ( $D_e$ ) belirlenmiştir. Bu amaçla Bölüm 3.2'de verilen kütle korunum temelli model ve Bölüm 4.2.3'de anlatılan deney sisteminde elde edilen veriler birlikte kullanılmıştır. Modelde (Eş.3.6) yer alan  $K$  denge değeri, farklı pH ve iyonik gerilimlerde yapılan adsorpsiyon deneyleri sonucu belirlenen değerlerdir. Etkin membran alanı  $A=0.785$  cm<sup>2</sup>'dir. Membran kalınlığı ( $h$ ), 100 kDa PES membran kesitini gösteren SEM fotoğrafından (Şekil 5.64) ortalama 200 µm olarak ölçülmüştür. Membran kalınlığı yüzey üzerinde her bölgede uniform olmadığı için  $h$ 'ın ölçümünden kaynaklanabilecek hatanın model ve deney verilerinin uyumundan bulunan  $D_e$ 'yi ne derece etkilediğini belirlemek amacıyla farklı  $h$  değerlerinde hesaplamalar yapılmıştır. Yapılan hassasiyet analizinde  $h$  değerinde çok büyük değişim olmadığı sürece  $h$ 'daki %5 lik değişimin  $D_e$ 'yi %5 değiştirdiği-  $D_e$ 'nin önemli ölçüde değişmediği belirlenmiştir (Çizelge 5.14). Membran gözenekliliği ( $\epsilon$ ) için de farklı değerler denenerek, gözenekliliğin çözümü fazla değiştirmede bulunduğu bulunduğundan (Çizelge 5.15) çözümde literatürde 100 kDa PES membran için verilen  $\epsilon=0.5$  değeri kullanılmıştır.

Çizelge 5.14. Membran kalınlığının ( $h$ ), etkin difüzyon katsayısına etkisi

Membran kalınlığı ( $h$ ), cm	0.019	<b>0.02</b>	0.0204	0.021	0.025
$D_e$ , m <sup>2</sup> /s	$3.6 \times 10^{-11}$	<b><math>3.8 \times 10^{-11}</math></b>	$3.8 \times 10^{-11}$	$3.9 \times 10^{-11}$	$4.8 \times 10^{-11}$



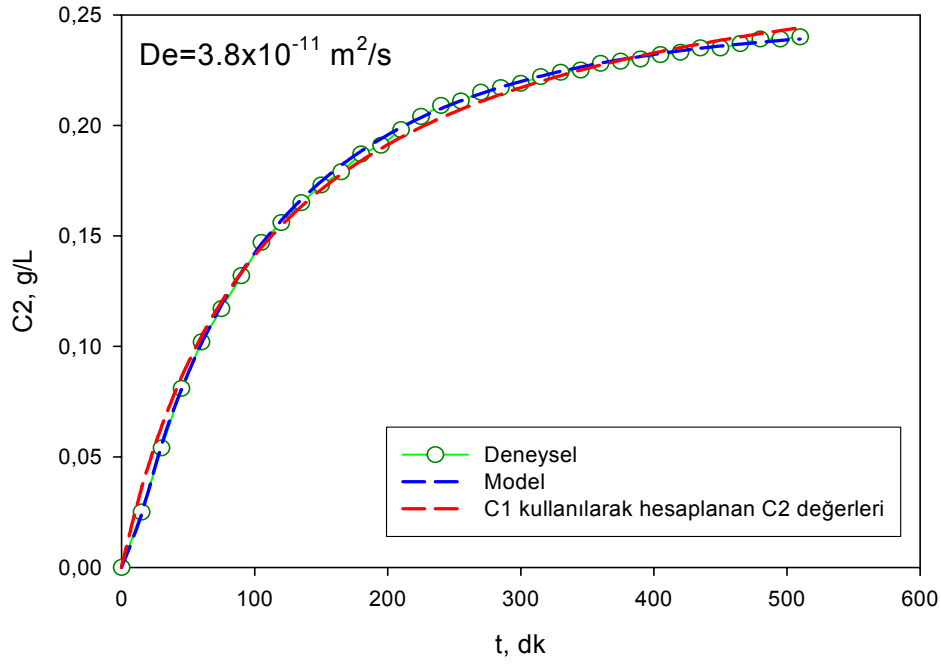
Şekil 5.64. 100 kDa temiz PES membranının SEM fotoğrafı

Çizelge 5.15. Membran gözenekliliğinin BSA etkin difüzyon katsayısına etkisi

Gözeneklilik ( $\epsilon$ )	0.1	0.4	0.5	0.8
$D_e, m^2/s$	$4 \times 10^{-11}$	$3.9 \times 10^{-11}$	$3.8 \times 10^{-11}$	$3.8 \times 10^{-11}$

Kurulan matematik modelin (Eş. 3.6) değişkenlere ayırma yöntemi ile yapılan genel çözümündeki (Eş.3.7) döngü sayısının ( $n$ ) belirlenebilmesi için farklı döngü sayılarında modelden derişim değerleri hesaplatılmış ve beş döngüden sonra hesaplanan derişim değerlerinin değişmeği bulunduğu için çözümde  $n=5$  değeri kullanılmıştır. EK 6'da döngü sayısı ile modelden bulunan derişim değerlerinin değişimini gösteren bir çizelge verilmiştir.

Difüzyon deneylerinde, Şekil 4.2'de gösterilen sistemde 2 nolu depodaki protein derişimleri deneysel olarak bulunurken 1 nolu depodaki derişimler Eş.3.12'de verilen kütle korunum denkleminde hesaplanmıştır. Hesaplanan derişimlerin kontrolü, 1 nolu depodaki protein derişim değerleri deneysel olarak ölçülerek yapılmıştır. Şekil 5.65'de,



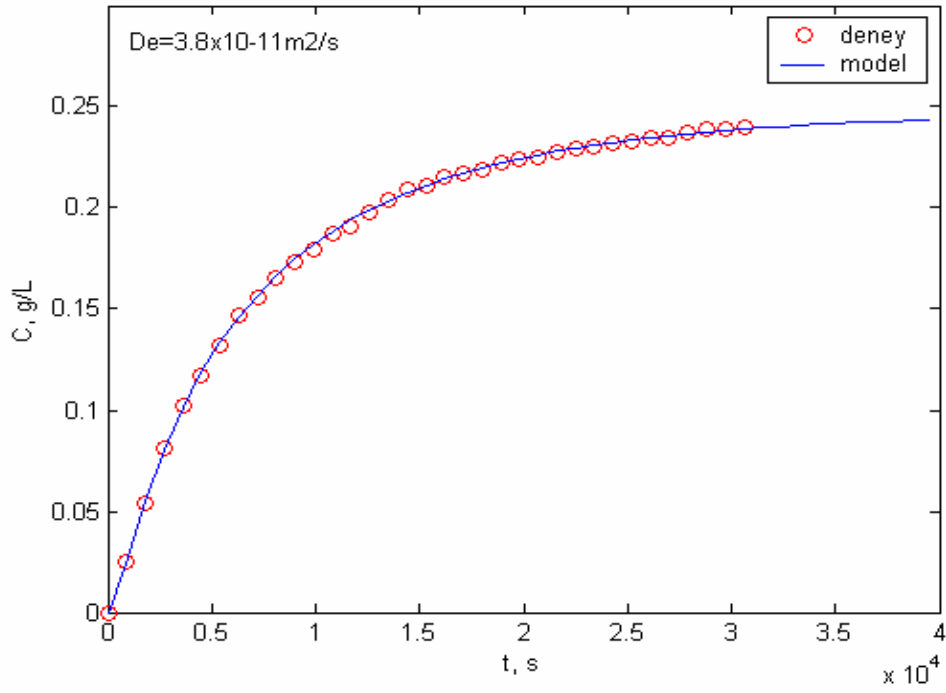
Şekil 5.65. Co=0.5 g/L BSA, pH=4.78, I=0.01 M koşullarında 100 kDa PES membranda BSA difüzyonu sırasında sıvı faz derişiminin zamanla değişimi kontrol deney sonuçları

1 nolu depodaki derişimin deneysel olarak belirlenerek modelde yerine konulması ile elde edilen C<sub>2</sub> değerleri, 1 nolu depoda kütle korunum denklemi kurulmasıyla bulunan C<sub>2</sub> değerleri ve deneysel olarak ölçülen C<sub>2</sub> değerlerinin zamanla değişimi yer almaktadır. Farklı yöntemlerle hesaplanan C<sub>2</sub> değerlerinin deneysel olarak belirlenen C<sub>2</sub> değerlerinden ortalama %2 ve %6 farklı olması, modelin çözümü için 1 nolu depodan örnek alınmaksızın kütle korunum denkleminin kullanılmasının yeterli olduğunu göstermektedir.

Şekil 5.66'da, BSA'nın etkin difüzyon katsayısının bulunması için yapılan çözüme örnek olarak, pH=4.78 değerinde 0.01 M KCl çözeltisi ile sağlanan iyonik gerilimde Co=0.5 g/L başlangıç BSA derişiminde 100 kDa PES membrandaki difüzyon sonucu elde edilen deneysel veriler ve modelden elde edilen veriler karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir. Bu koşullarda deney verileri ile model sonuçlarının en iyi uyum sağladığı De değeri 3.8x10<sup>-11</sup> m<sup>2</sup>/s olarak belirlenmiştir. Çizelge 5.16'da bu koşullara ait deney ve

model verileri yer almaktadır. Deneysel olarak ve modelden elde edilen her bir nokta arasındaki fark değerleri hesaplanarak ortalama % 0.7 olarak bulunmuştur. Diğer iyonik çevre koşullarında yapılan deney ve model verileri ise EK 7’de verilmiştir.

Çizelge 5.17’de, farklı pH ve iyonik gerilim değerlerinde yapılan deneyler sonucunda belirlenen BSA’nın etkin difüzyon katsayıları yer almaktadır. İncelenen pH değerlerinde, iyonik gerilimin artması ile difüzyon katsayısı artmış, pH’ın artması ise her iki iyonik gerilim değerinde de  $D_e$ ’yi önce artırmış, sonra azaltmıştır.



Şekil 5.66.  $C_0=0.5$  g/L BSA, pH=4.78, I=0.01 M koşullarında 100 kDa PES membranda BSA difüzyonu sırasında sıvı faz derişiminin zamanla değişimi: Deney ve model verileri

Çizelge 5.16. pH=4.78, 0.01 M KCl ve Co=0.5 g/L başlangıç derişiminde BSA'nın 100 kDa PES membrandan difüzyonu: Deney ve model verileri

t, dk	C <sub>deney</sub>	C <sub>model</sub>	%fark
0	0.000	0.000	0.00
15	0.025	0.024	4.00
30	0.054	0.055	-2.04
45	0.081	0.080	-1.85
60	0.102	0.101	0.98
75	0.117	0.119	-1.37
90	0.132	0.133	-1.06
105	0.147	0.146	0.61
120	0.156	0.157	-0.58
135	0.165	0.166	-0.85
150	0.173	0.175	-1.16
165	0.179	0.182	-1.62
180	0.187	0.188	-0.70
195	0.191	0.194	-1.52
210	0.198	0.199	-0.51
225	0.204	0.204	0
240	0.209	0.208	0.48
255	0.211	0.211	0
270	0.215	0.214	0.33
285	0.217	0.217	0
300	0.219	0.220	-0.37
315	0.222	0.222	0
330	0.224	0.224	0
345	0.225	0.226	-0.58
360	0.228	0.228	0
375	0.229	0.230	-0.31
390	0.230	0.231	-0.48
405	0.232	0.233	-0.22
420	0.233	0.234	-0.30
435	0.235	0.235	0
450	0.235	0.236	-0.34
465	0.237	0.237	0.13
480	0.239	0.238	0.63
495	0.239	0.238	0.29
510	0.240	0.239	0.42

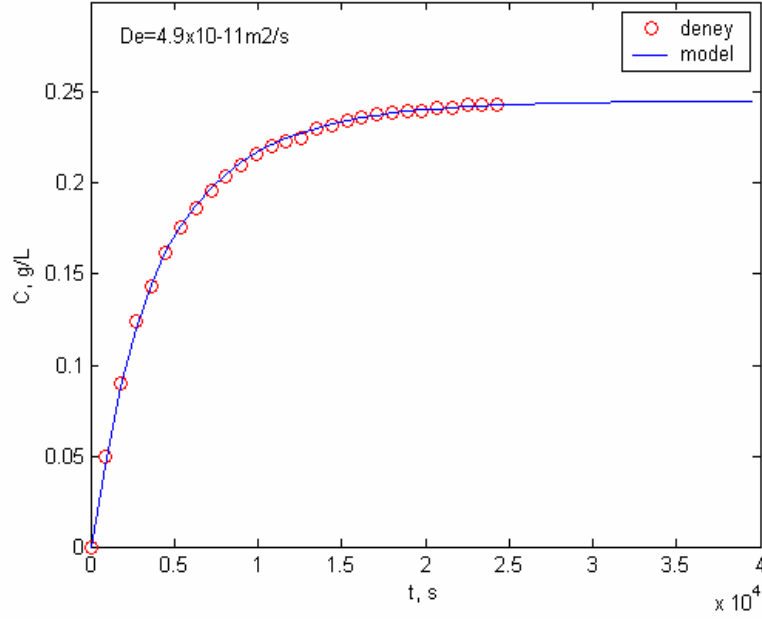
Çizelge 5.17. Farklı iyonik çevrelerde Co=0.5 g/L derişiminde BSA'nın 100 kDa PES membranlarda etkin difüzyon katsayıları

pH	0.01M	0.1 M
	D <sub>e</sub> , m <sup>2</sup> /s	D <sub>e</sub> , m <sup>2</sup> /s
3.78	1.9x10 <sup>-11</sup>	2.6x10 <sup>-11</sup>
4.78	3.8x10 <sup>-11</sup>	4.4x10 <sup>-11</sup>
6.80	3.2x10 <sup>-11</sup>	3.8x10 <sup>-11</sup>

### 5.9.2. SAP etkin difüzyon katsayısının iyonik çevre ile değişimi

SAP'ın 100 kDa PES membranlardaki etkin difüzyon katsayıları  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  ve tüm bileşenleri içeren çözeltiler ile  $\text{pH}=7.14$  ve  $C_0=0.5$  g/L başlangıç enzim derişimlerinde -adsorpsiyon deneylerinin yapıldığı koşullarda gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Şekil 5.67'de -örnek olarak-  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ortamında yapılan difüzyon deneyleri sonucunda elde edilen verilerin modelden hesaplanan veriler ile karşılaştırması yer almaktadır.  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ortamında model ve deney sonuçlarının en iyi uyum gösterdiği  $D_e$  değeri  $4.9 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s olarak belirlenmiştir. Bu deneye ait model ve deney sonuçları ile deneysel ve modelden elde edilen noktalar arasında % fark değerleri Çizelge 5.18'de verilmiştir.

Deney ile model verileri arasındaki farkın ortalama değeri %0.88'dir. Diğer iyonik çevre koşullarında gerçekleştirilen deney sonuçları ise EK 8'de verilmiştir. Çizelge 5.19'da 100 kDa PES membranlarda  $\text{pH}=7.14$  ve fermentasyon ortam bileşenleri varlığında deney ve model sonuçlarının uyumuna göre belirlenmiş olan etkin difüzyon katsayıları yer almaktadır. SAP'ın PES membranlardaki en yüksek difüzyon katsayısı tüm bileşenleri içeren ortamda bulunurken, en düşük difüzyon katsayısı  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  içeren ortamda olmuştur.



Şekil 5.67. Co=0.5 g/L, pH=7.14, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ortamında 100 kDa PES membranda SAP difüzyonu sırasında sıvı faz derişiminin zamanla değişimi: Deney ve model verileri

Çizelge 5.18. Co=0.5 g/L, pH=7.14, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ortamında SAP'ın 100 kDa PES membrandan difüzyonu: Deney ve model verileri

<b>t, dk</b>	<b>C<sub>deney</sub></b>	<b>C<sub>model</sub></b>	<b>%fark</b>
0	0.000	0.000	0.000
15	0.050	0.044	12.000
30	0.090	0.088	2.000
45	0.124	0.120	3.065
60	0.143	0.144	-0.699
75	0.162	0.162	-0.247
90	0.176	0.177	-0.455
105	0.186	0.188	-1.290
120	0.196	0.198	-0.816
135	0.204	0.205	-0.637
150	0.210	0.212	-0.951
165	0.216	0.217	-0.324
180	0.221	0.221	0
195	0.223	0.225	-0.89
210	0.225	0.228	-1.3
225	0.230	0.230	0
240	0.232	0.233	0
255	0.235	0.235	0
270	0.236	0.236	0
285	0.238	0.238	0
300	0.239	0.239	0
315	0.240	0.240	0
330	0.240	0.241	-0.416
345	0.242	0.241	0.413
360	0.242	0.242	0
375	0.243	0.242	0.288
390	0.243	0.243	0
405	0.243	0.243	0

Çizelge 5.19. SAP'ın fermentasyon ortamını bileşenlerinin varlığında Co=0.5 g/L derişiminde, pH=7.14'de 100 kDa PES membranlarda etkin difüzyon katsayıları

<b>Bileşen</b>	<b>De, m<sup>2</sup>/s</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.9x10 <sup>-11</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.3x10 <sup>-11</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.9x10 <sup>-11</sup>
CaCl <sub>2</sub>	7.4x10 <sup>-11</sup>
Tüm bileşenler	8.0x10 <sup>-11</sup>

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteinlerin membranlara adsorpsiyonu, birden çok etkileşimin eş zamanlı olarak meydana gelmesi sonucu gerçekleştiği için kompleks bir mekanizmaya sahiptir. Hem protein hem de membranların iyonik çevre şartlarına duyarlık göstermesi literatürde yer alan sonuçlar arasında farklılık doğurmaktadır. Bu çalışmada, PES ve CTA membranlara ait fiziksel ve kimyasal özellikler ile BSA ve SAP protein çözeltilerine ait pH, iyonik gerilim gibi iyonik çevreyi oluşturan değerlerin protein-membran etkileşimlerine etkisi statik adsorpsiyon deneyleri ile incelenmiş; elde edilen bulguların desteklenmesi için elektrokinetik deneyler ve hesaplamalar (Bölüm 5.5.1-5.5.3) ile membranlarla protein arasındaki elektrostatik ve van der Waals etkileşim enerjileri toplamı (Bölüm 5.5.4) belirlenmiş ve ayrıca spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle (Bölüm 5.4.3-5.4.5) adsorpsiyon sonucu membranların yüzey yapısında meydana gelen değişimler gözlenerek birlikte yorumlanmıştır. Böylece literatürde ayrı ayrı ele alınmış olan membran kirliliğini etkileyen parametrelerin birlikte incelenmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi yapılmıştır. Ayrıca, membranlarla ayırma işlemlerinde önemli bir tasarım parametresi olan proteinlerin membran sistemlerdeki etkin difüzyon katsayısının bulunması ve farklı iyonik çevrelerde oluşan membran kirliliği ile ilişkilendirilmesi - literatürde benzer bir çalışma yer almadığından- çalışmanın orijinalliğini artırmıştır.

### 6.1. BSA'nın PES (10 kDa ve 100 kDa) ve CTA (10 kDa) Membranlara Adsorpsiyonu

Farklı pH ve iyonik gerilim değerleri için BSA'nın 10 kDa PES membranlara adsorpsiyon izotermleri karşılaştırmalı olarak Şekil 5.6'da, 10 kDa CTA membranlara adsorpsiyon izotermleri ise Şekil 5.12'de verilmiştir. İki membranda da BSA'nın adsorpsiyonu partiküller arası etkileşim varsayımını göz önüne alarak deneysel olarak türetilen Freundlich izotermine uymaktadır (Çizelge 5.1 ve 5.2).

10 kDa PES membranlara iki ayrı iyonik gerilim değerinde (0.01 ve 0.1 M) de izoelektrik noktada adsorplanan protein miktarının, izoelektrik noktanın altında ve üzerindeki diğer iki pH değerlerine göre az olduğu bulunmuştur. Proteinlerin izoelektrik noktasında (BSA için  $pI=4.78$ ) net yükü sıfırdır. Dolayısıyla bu pH değerinde proteinin membran ile elektrostatik etkileşimi en az seviyede olmalıdır; bu çalışmada da izoelektrik noktada BSA'nın membrana adsorpsiyonunun en az olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, protein adsorpsiyonunda elektrostatik etkileşimlerin önemli olduğunu göstermektedir. Ancak izoelektrik noktada bir miktar adsorpsiyonun gözlenmesi protein-membran etkileşimlerinde diğer ara yüzey kuvvetlerinin de önemli olduğunun kanıtıdır. İzoelektrik noktasında oldukça hidrofob yapıya sahip olan protein ile, hidrofob yapıdaki PES membran arasındaki hidrofobik etkileşimler sonucu bir miktar adsorpsiyon gözlenmiştir. Ayrıca izoelektrik noktanın altındaki  $pH=3.78$ 'de izoelektrik nokta ve üzerindeki pH değerlerine göre daha fazla protein adsorplanmıştır. Bu pH değerinde pozitif yüke sahip olan protein ile literatürde belirtildiği gibi (Ricq vd 1997; Ernst vd 2000) ve ayrıca bu çalışmada da ölçülerek belirlendiği gibi negatif yük taşıyan membranlar (izelge 5.5) arasındaki elektrostatik çekme kuvvetlerinden dolayı adsorpsiyon fazla olmuştur. İzoelektrik noktanın üzerinde  $pH=6.80$ 'de ise aynı yükteki (negatif) protein ile membran arasında elektrostatik itme kuvvetleri söz konusudur ve izoelektrik noktanın altındaki pH değerine göre daha az; ancak izoelektrik noktaya göre daha fazla adsorpsiyon olmuştur.

Çözelti pH'nın membran kirliliği üzerine etkisi literatürde birçok araştırıcı tarafından incelenmiş ve çeşitli görüşler ortaya çıkmıştır. Bazı araştırıcılar, proteinlerin izoelektrik noktasında hidrofob karakterlerinin artması nedeniyle gösterdikleri hidrofobik etkileşimlerden dolayı kirliliğin bu noktada fazla olduğunu (Möckel vd 1999, Xu vd 2003) belirtmişlerdir. Diğer bir grup araştırıcı ise izoelektrik noktada elektrostatik itmenin azalması nedeniyle proteinlerin daha kolay agregasyona uğramaları sonucu bu noktada kirliliğin fazla olduğunu öne srmşlerdir (Kelly ve Zydney 1994). İzoelektrik noktayla ilgili diğer bir görüş ise, membrandan protein geçişinin en fazla dolayısıyla membran kirliliğinin en az olduğu pH değerinin izoelektrik nokta olmasıdır (Mattiason 1983, Nyström vd 1994, Ricq vd 1999, Burns ve Zydney 1999). Bu görüş birliği içinde bulunan bazı araştırıcılar, bu durumu yk etkilerine bağlayarak izoelektrik noktada

elektrostatik itme kuvvetlerinin olmaması nedeniyle protein geçişinin arttığını bildirirken, bazıları da izoelektrik noktada boyutu en küçük olan proteinin membrandan rahatlıkla geçebileceğini, bu nedenle kirliliğin az olduğunu belirtmişlerdir.

Farklı işletim koşullarında, kirliliği yaratan temel mekanizma ve proteinlerin en önemli özelliklerinin hangisi olduğu farklı olabilir. Eğer proteinlerin membrana adsorpsiyonu sadece elektrostatik etkileşimlerle açıklanacak kadar basit bir mekanizması olsaydı, izoelektrik noktanın üzerindeki davranış -itme kuvvetlerinin baskın olmasına rağmen adsorpsiyon olması- beklenmezdi. Ancak, protein adsorpsiyonu elektrostatik, hidrofobik, hidrofilik ve sterik etkileşimler gibi birçok etkileşimi içeren kompleks bir olaydır. BSA'nın membranlara adsorpsiyonunda rol alan etkileşim enerjileri ile ilgili tartışma Bölüm 6.3'de de yapılmıştır.

10 kDa CTA membranlara 0.01 M ve 0.1 M iyonik gerilimlerde izoelektrik noktada (pH=4.78) adsorplanan BSA miktarının -10 kDa PES membranlar için elde edilen sonuçlara benzer olarak- izoelektrik noktanın üzerinde (pH=6.80) adsorplanan değere göre az olduğu bulunmuştur (Şekil 5.12). İzoelektrik noktada net yükü sıfır olan proteinin, bu pH değerinde membran ile elektrostatik etkileşimi en az seviyede olduğu için membranlara adsorpsiyonu azalmıştır. İzoelektrik noktasının üzerinde negatif yüklü protein ile negatif yüklü membran arasında elektrostatik itme kuvvetleri baskın olmasına rağmen izoelektrik noktaya göre fazla adsorpsiyon gözlenmiştir.

CTA ile PES membranların adsorpsiyon kapasiteleri karşılaştırıldığı zaman CTA membranlarda daha az protein adsorpsiyonu gözlenmiştir. Aradaki bu farkın, öncelikle PES membranların hidrofob özelliğinden dolayı proteinle hidrofobik etkileşimler yapabilme gücüne ve ayrıca membranların farklı yük büyüklüklerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar son zamanlarda literatürde protein adsorpsiyonunda esas itici gücün hidrofobik etkileşimler olduğunu, bunun yanında elektrostatik etkileşimlerin de önemli olduğunu belirten çalışmalar ile membranlara adsorpsiyonu proteinin net yük değerinin değil yüzey yükünün kontrol ettiğini ve adsorpsiyonda elektrostatik etkileşimlerin önemli olduğunu belirten iki ayrı görüş olmasına rağmen (Yoon vd 1999), bu çalışmada aynı iyonik çevre koşullarında PES ve CTA membranlara adsorplanan

protein miktarları arasındaki farkın membranların kimyasal yapısından kaynaklandığı, dolayısıyla adsorpsiyonda yapısal etkileşimlerin yük etkileşimleri kadar önemli olduğunu belirlenmiştir.

100 kDa MWCO değerindeki PES membranlara BSA adsorpsiyonunda pH ve iyonik gerilim etkisi 10 kDa PES membranlardakine benzer davranış göstermiş, izoelektrik noktada adsorplanan protein miktarının en az, izoelektrik noktanın altında ise fazla olduğu, izoelektrik noktanın üzerinde ise itme kuvvetleri baskın olmasına rağmen izoelektrik noktaya göre daha fazla adsorpsiyon olduğu ve iyonik gerilimin artması ile azalan yük etkileşimleri nedeniyle adsorplanan protein miktarının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 5.20). 10 kDa PES membrana kıyasla 100 kDa PES membranda protein adsorpsiyonu daha az olmuştur. 10 kDa PES membranda membran gözenek yarıçapı, protein yarıçapından küçük olduğu için protein adsorpsiyonu membran yüzeyinde meydana gelmiş ve protein molekülleri membran yüzeyinde Şekil 5.34’de verilen SEM fotoğraflarında da görüldüğü gibi jel şeklinde birikmiştir. 100 kDa PES membranda ise membran gözenek yarıçapı, protein yarıçapından büyük olduğu için gözenek içine giren ve gözenek duvarlarına çarparak ilerleyen protein moleküllerinin membran ile sterik etkileşimleri 10 kDa membrandaki kadar güçlü olmamıştır. 100 kDa PES membranda protein moleküllerinin bir kısmı adsorplanırken bir kısmı da membrandan geçerek gözenek çıkışına ilerlemiş; dolayısıyla adsorpsiyon daha az olmuştur. Protein adsorpsiyonunun membran yüzeyinden çok gözenek içinde olduğu düşünülmektedir. Şekil 5.35’deki SEM fotoğraflarında da, BSA adsorpsiyonu sonucu 100 kDa PES membranların gözeneklerindeki daralma açıkça görülmektedir. Bu sonuç protein membran etkileşimlerinde adsorpsiyon konumunun önemli olduğunu göstermektedir.

İyonik gerilimin artması ile çalışılan tüm pH değerlerinde PES ve CTA membranlara adsorplanan protein miktarı azalmıştır. 0.01 M iyonik gerilim değerinde çift tabaka kalınlığı  $\kappa^{-1}=3.07 \times 10^{-9}$  m iken iyonik gerilimin 10 kat artması ile -0.1 M iyonik gerilimde-  $\kappa^{-1}=9.69 \times 10^{-10}$  m değerine düşmüştür (Bölüm 5.5.3). İyonik gerilimin artması, difüz tabaka ve Stern tabakasının üst üste gelmesine, yani çift tabaka yapısının

bozularak deforme olmasına ve kabuk etkisi yaratarak yüzey yükünün azalmasına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda ise protein-membran elektrostatik etkileşimleri azalmıştır.

## **6.2. BSA Adsorpsiyonu Sonucunda Membran Yapısında Meydana Gelen**

### **Değişimler**

BSA'nın adsorpsiyonu sonucu kirlenen 10 ve 100 kDa PES ile 10 kDa CTA membranların yüzey ve gözenek yapısında meydana gelen değişimler FTIR-ATR ve SEM analizleri ile, ayrıca 10 kDa PES membran yapısında meydana gelen değişimler ek olarak AFM analizi ile belirlenmiştir.

Farklı pH ve iyonik gerilim değerlerinde BSA'nın PES ve CTA membranlara adsorpsiyonu sonucu membran yüzeyinde protein varlığının bir göstergesi olan C=O gerilmesinden kaynaklanan amid I bandları gözlenmiştir (Şekil 5.21, Şekil 5.23 ve 5.24, Şekil 5.27-5.29, Şekil 5.32 ve 5.33). Proteinin izoelektrik noktasında (pH=4.78) her iki membranda da amid I bölgesinde gözlenen pik şiddetinin diğer iki pH değerlerine göre daha az olması izoelektrik noktada adsorpsiyonun az olduğunu, izoelektrik noktanın altında pH=3.78 değerinde amid I pik şiddetinin diğer pH değerlerine göre fazla olması izoelektrik noktasının altında adsorpsiyonun fazla olduğunu ve izoelektrik noktanın üzerindeki pH=6.80 değerinde -itme kuvvetleri baskın olmasına rağmen- amid I pikinin gözlenmesi ve şiddetinin izoelektrik noktaya göre fazla olması FTIR-ATR analizlerinin adsorpsiyon sonuçlarıyla örtüştüğünü göstermektedir. Fazla adsorpsiyon görülen pH değerinde amid I bandının şiddeti fazladır, amid I bandlarının şiddeti kirliliğin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Ayrıca adsorpsiyonun fazla olduğu koşullarda amid II bandları da gözlenmiştir. CTA membrandaki amid I pikinin şiddeti PES membranlardaki kadar güçlü değildir. CTA membranın hidrofil yapısı ve taşıdığı düşük yük değeri nedeniyle, PES membrana göre daha az adsorpsiyon meydana gelmesi beklenen bir sonuçtur. 100 kDa PES membranda daha az adsorpsiyon gözlenmesine

rağmen amid I ve amid II bandlarının şiddeti 10 kDa PES membrandan fazladır. Bunun nedeni, her iki membranın kirlendiği başlangıç protein derişimlerinin (10 kDa membran için  $C_0=1$  g/l, 100 kDa membran için  $C_0=2.5$  g/L) farklı olmasıdır. Amid I piklerinin şiddeti sıvı faz başlangıç protein derişimi ile değişmektedir. Ayrıca iyonik gerilimin artması ile azalan adsorpsiyona karşılık, bu koşullarda analizlenen her koşul için amid I piklerinin şiddeti azalmıştır. (Şekil 5.25-26, Şekil 5.30-5.31). Dolayısıyla FTIR-ATR analizleri membran kirliliğinin bir belirleyicisi olabilecek bir analiz yöntemidir.

Temiz ve kirli PES ve CTA membranların SEM fotoğraflarında, temiz membranların gözeneklerinin açık olduğu gözlenirken, (5.35 a), BSA adsorpsiyonu sonucu kirlenmiş olan 10 kDa PES membranın yüzeyinin jel şeklinde protein tabakası ile kaplı olduğu ve yüzey yapısının değiştii (Şekil 5.34); 100 kDa PES membranlarda gözenek yapısının değiştii (Şekil 5.35 b,c); CTA membranın ise yüzey yapısının fazla değişmediği (Şekil 5.36 b) gözlenmiştir. SEM fotoğrafları membranlardaki kirlilik şeklinin belirlenmesinde yardımcı olduğu gibi adsorpsiyon sonuçlarıyla da uyum göstermiş, CTA membranlara protein adsorpsiyonunun PES membranlardan daha az olduğunu kanıtlamıştır.

Farklı pH değerlerinde BSA ile kirlenmiş 10 kDa PES membranların üç boyutlu AFM görüntülerinden membran yüzeyin yapısındaki değişimin pH=3.78'de en fazla, pH=4.78'de en az olduğu açıkça görülmektedir. Bu bulgular SEM ve FTIR-ATR ile birlikte adsorpsiyonun pH ile değişim davranışını ve izoelektrik noktada adsorpsiyonun en az olduğu sonucunu desteklemektedir (Şekil 5.37-5.40).

### **6.3. Protein (BSA)-Membran Etkileşim Enerjileri**

DLVO teorisine göre elektrostatik ve van der Waals enerjilerinin toplamı, etkileşimde itme veya çekme kuvvetlerinin durumunu belirlemektedir (Bölüm 2.4.1.3). Çekme kuvvetlerinin etkin olduğu durumda bu toplamın işareti negatif, itme kuvvetlerinin etkin

olduğu durumunda ise pozitifdir. Düşük iyonik gerilimlerde elektrostatik etkileşimler güçlü, yüksek iyonik gerilimde ise elektrostatik etkileşimler zayıftır.

PES ve CTA membranların zeta potansiyelleri çalışılan tüm koşullarda anyonların tercihli adsorpsiyonu nedeniyle (Cheryan 1998) negatif işaretlidir (Çizelge 5.5-5.6). pH'ın artması ile zeta potansiyelinin nominal değerleri artarken iyonik gerilimin artması ile azalmıştır. Kolloidal yapılarından dolayı proteinlerin zeta potansiyelleri iyonik çevreye göre farklılıklar göstermiş, pI'nın altında pozitif, pI'nın üzerinde negatif değerler alırken iyonik gerilimin artması ile azalmıştır (Çizelge 5.7).

BSA'nın ultrafiltrasyon membranlara adsorpsiyonu izoelektrik noktasında en az, izoelektrik noktasının altında ise en fazla olmuştur. Çizelge 5.8-5.10'da verilen protein-membran etkileşim enerjilerinin büyüklükleri -sadece elektrostatik ve van der Waals enerjilerini içermesine rağmen- bu davranışın nedenini açıklamada yardımcı olmaktadır. İzoelektrik noktasında (pH=4.78) net yükü sıfır olan, ancak yüzey yükünün uniform olmaması nedeniyle yine de elektrostatik etkileşimler gösterebilen proteinin PES ve CTA membranlar ile toplam etkileşim enerjisi en az seviyede olduğu için proteinin membrana adsorpsiyonu da en az olmuştur. pH=3.78'de pozitif yüke sahip olan protein ile akım potansiyeli ölçüm yöntemi ile negatif yüke sahip olduğu belirlenen PES membran arasındaki çekme kuvvetlerinin itme kuvvetlerine baskın olması nedeniyle izoelektrik nokta ve üzerindeki pH değerlerine göre daha fazla protein adsorplanmıştır. Benzer şekilde Burns ve Zydney (1999) protein ve membranın zıt yüklere sahip oldukları durumda membranda protein geçişindeki azalmayı itme kuvvetlerinin azalmasına bağlamışlardır. İzoelektrik noktanın üzerinde (pH=6.80) ise ikiside negatif yüklü olan protein ile PES ve CTA membranlar arasında elektrostatik kuvvetler ve van der Waals kuvvetleri itme yönünde olmasına rağmen, özellikle hidrofobik etkileşimler gibi diğer ara yüzey etkileşim kuvvetlerinin etkisiyle adsorpsiyon gözlenmiştir. İyonik gerilimin artması ile tüm pH değerlerinde çift tabaka yapısının bozulmasından dolayı toplam etkileşim enerjisi azalmıştır. Değişen iyonik çevre koşullarında elektrostatik, van der Waals, hidrofobik ve hidrofilik etkileşimler gibi adsorpsiyonda etkin olan ara yüzey

etkileşim kuvvetlerinin farklı değerler alması adsorplanan protein miktarlarını etkilemiştir. Kolloidal ara yüzey etkileşimleri klasik DLVO teorisi ile, yani sadece elektrostatik ve van der Waals kuvvetler ile açıklanmaktadır. Membran kirliliğini sadece bu iki kuvvete dayalı olarak açıklamak ön bilgi oluşturulması açısından önemlidir. Klasik DLVO hesaplamaları ve deneysel sonuçlar arasındaki fark, -ki bu çalışmada membranın kimyasal yapısı, heterojenliği ve diğer etkileşim kuvvetlerine dayandırılmıştır- teoriye bazı mekanizma ve hipotezler eklenerek açıklanabilir. Homojen bir yüzeye kıyasla, morfolojik ve kimyasal heterojenlikler, farklı enerji dağılımına sebep olabilir. Bu gibi durumlarda DLVO teorisinin hidrofobik, hidrofilik ve sterik etkileşimler gibi yapısal etkileşimleri de göz önüne alarak genişletilmesi gerekmektedir.

#### **6.4. SAP'ın 100 kDa PES Membranlara Adsorpsiyon Sonuçları**

Bu çalışmada model enzim olarak kullanılan serin alkali proteazın (SAP) membranlar ile arasındaki etkileşimleri inceleyen bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle, fermentasyon ortamından bir enzimin ayrılmasındaki ara yüzey etkileşimlerinin ve membran ile enzim özelliklerindeki değişimlerin incelenmesi önem taşımaktadır.

Enzimlerin membranlara adsorpsiyonu çeşitli mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiği için sonuçlar tek bir etkileşim mekanizmasına göre değil, birkaç mekanizmanın birlikte etkisi ile açıklanabilir. SAP'ın 100 kDa PES membranlara farklı iyonlarla sağlanan 0.218, 0.224, 0.263, 0.434 ve 0.484 M iyonik gerilim değerlerinde, üretim pH'ı olan izoelektrik noktasının altındaki pH=7.14 değerinde, pozitif yüklü enzim ile negatif yüklü membran arasındaki elektrostatik çekme kuvvetlerinin baskın olması nedeniyle adsorpsiyon en fazla olmuştur (Şekil 5.47). İzoelektrik noktasında (pI=9.08) enzim yapısının daha kompakt ve hidrofobik olması nedeniyle hidrofobik etkileşimler göstererek enzim adsorpsiyonu gerçekleşmiş, ancak net yükü sıfır olduğu için negatif

yüklü membran ile enzim arasında elektrostatik etkileşimlerin minimum olması sonucu adsorpsiyon da en az olmuştur. İzoelektrik noktasının üzerindeki pH= 11.06 değerinde ise negatif yüklü membran ile anyon formundaki enzim arasında elektrostatik itme kuvvetleri baskın olmaya başlamış, dolayısıyla; izoelektrik noktanın altındaki pH değerinden az, ancak izoelektrik noktaya göre fazla adsorpsiyon gözlenmiştir. Bu pH'da adsorpsiyonda etkin olan kuvvetlerin hidrofobik etkileşimler olduğu düşünülmektedir.

Fermentasyon ortamı tuz/tampon iyonları yanında hücre tarafından üretilen amino asit, organik asit ve yapısal proteinler gibi birçok metaboliti de içeren kompleks bir ortamdır. Ortamdaki sterik etkileşimler ve üretim sırasında oluşan ve iyonlaşabilen diğer bileşenler de ara yüzey etkileşimlerini etkileyeceği için fermentasyonla üretilen enzimin 100 kDa PES membrana adsorpsiyonu daha fazla olmuştur. Sentetik ve gerçek fermentasyon ortamlarındaki adsorpsiyon izotermeleri karşılaştırıldığında (Şekil 5.52 ve 5.54) fermentasyon ortamındaki enzimin daha fazla kirlilik yarattığı görülmektedir.

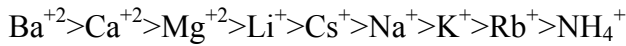
Endüstriyel bir enzim olan SAP'ın fermentasyon ortamından membranla ayrılması sırasında meydana gelen kirliliği incelemek amacıyla, enzim üretim ortamında bulunan iyonların (Çizelge 4.3) tek tek ve birlikte etkisi adsorpsiyon deneyleri ile incelenmiştir. Fermentasyon ortam pH değeri (7.14) SAP'ın izoelektrik noktasının altında bir değer olduğu için enzim her çözeltide pozitif yüklüdür. Ancak proteinin yük değeri ve hidrofob özelliği ortamın iyonik geriliminden etkileneneği için, iyonların ara yüzey etkileşimlerindeki rolü hem membran hem de protein üzerine olacaktır. Her iyonun proteinin yapısı ve membranın yük değeri üzerine etkisi farklı olacağı için SAP'ın üretim ortamı bileşenlerinin varlığında membranlara adsorpsiyonu farklılıklar göstermiştir.

Hofmeister serileri proteinlerin çökmesinde etkili olan anyon ve katyonların sıralamasını tanımlamaktadır (Leontidis 2002). Bu tanımdan yararlanarak proteinlerin

membran yüzeyine adsorpsiyonunda protein/enzim davranışına iyonların etkisi açıklanabilir. Bu seriye göre proteinlerin çözünürlüğünü azaltan anyonlar:



protein çözünürlüğünü artıran katyonlar:



olarak sıralanmaktadır. SAP enzimi en fazla  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  içeren ortamda adsorplanmıştır (Şekil 5.52). Ortamda bulunan fosfat tamponuna ek olarak ortama giren  $\text{HPO}_4^{-2}$  iyonlarının proteinin çözünürlüğü üzerine ek bir etkisi -zaten ortamda var olduğu için- olmadığı düşünülmektedir. Ancak  $\text{NH}_4^+$  katyonu proteinlerin çözünürlüğünü  $\text{Na}^+$  katyonuna göre daha da azaltarak membrana daha fazla adsorplanmasını sağlamıştır.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ortamındaki SAP adsorpsiyonu,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ortamına göre daha az olmuştur. Hofmeister serisine göre,  $\text{K}^+$  katyonu proteinlerin çözünürlüğünü  $\text{NH}_4^+$  katyonundan daha fazla artırmıştır. Dolayısıyla SAP'ın membrana adsorpsiyonu azalmıştır.  $\text{CaCl}_2$  ortamında ise ortama farklı anyon ve katyon girmektedir.  $\text{Ca}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  diğer ortamlar dikkate alındığında proteinlerin çözünürlüğünü artıran iki iyon olarak Hofmeister serilerinde görülmektedir. Dolayısıyla ortamda bu iyonların varlığı, proteinlerin çözünürlüğünün artmasına ve adsorpsiyonun daha az olmasına neden olmuştur. Protein-iyon etkileşimleri molekül içi elektrostatik ve hidrofobik değişimler ile proteinlerin üç boyutlu yapısının değişimine sebep olmaktadır (Menon ve Zydney 1999).

## 6.5. İyonik Çevrenin 100 kDa PES Membranların Zeta Potansiyelleri Üzerine

### Etkisi

SAP'ın adsorpsiyonunun gerçekleştirildiği tüm çözeltilerde Çizelge 5.13'de görüldüğü gibi anyonların tercihli adsorpsiyonu nedeniyle (Cheryan 1998) membranlar negatif yük değeri/zeta potansiyeli kazanmışlardır.  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  içeren ortamda -fosfat tamponundaki anyonlara ek olarak- ortama (-2) değerlikli  $\text{HPO}_4^{-2}$  iyonları girmiş ve bu iyonlar membran zeta potansiyelini artırarak elektrostatik etkileşimlerin ve dolayısıyla adsorpsiyonun artmasını sağlamıştır.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren ortamda ise (-1) değerlikli  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  anyonu fosfat tamponundaki anyonlara ek olarak ortamda bulunmaktadır.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ortamındaki SAP adsorpsiyonu,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ortamına göre daha az olmuştur; bu da (-1) değerlikli anyonların membran yüzeyine adsorpsiyonun (-2) değerlikli anyonlara göre daha az seçimli olduğu göstermektedir.  $\text{CaCl}_2$  ortamında membranın zeta potansiyeli  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  içeren ortamdan daha düşük olduğu için,  $\text{CaCl}_2$  ortamında elektrostatik etkileşimler daha zayıf, dolayısıyla enzim adsorpsiyonu daha az olmuştur. Ricq vd (1997) de iki değerlikli iyonların adsorpsiyonu ile zeta potansiyelinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bileşenlerin tümünü içeren ortamda ise iyonik gerilimin artması ile çift tabaka kalınlığını azaltmış, bunun sonucunda da membran yüzey yükü azalmış (Çizelge 5.13) ve adsorpsiyon diğer ortamlara göre daha az olmuştur (Şekil 5.52). Dolayısıyla adsorpsiyon ortamında izoelektrik noktanın altındaki pH değerinde çalışıldığı için negatif yüklü membran ile pozitif yüklü enzim arasındaki elektrostatik çekme kuvvetlerinin büyüklüğünü membran zeta potansiyeli belirlemektedir; bu değer yüksek olduğu ortamda etkileşim enerjileri de fazladır. Çizelge 5.13'de verilen kirli membranların zeta potansiyellerindeki işaret değişimi membran yüzeyine pozitif yüklü enzimin adsorplandığını göstermektedir

## **6.6. SAP Adsorpsiyonu Sonucunda Membran Yapısında Meydana Gelen Değişimler**

Sentetik olarak oluşturulan SAP enzimi üretim ortamında bulunan bileşenlerin, 100 kDa PES membranlara adsorpsiyonuna etkileri incelendikten sonra kirlenen membranların yüzey yapısındaki değişimleri belirlemek amacıyla yapılan FTIR-ATR analizlerinde, her durumda membran yüzeyinde protein adsorpsiyonunun bir kanıtı olan  $1650\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı civarında amid I pikleri gözlenmiştir. Adsorpsiyonun fazla olduğu ortamda  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ortamında amid I pikinin şiddeti fazla, az olduğu tüm bileşenleri içeren ortamda pik şiddeti azdır. Dolayısıyla FTIR-ATR spektrumları adsorpsiyon sonuçlarını desteklemektedir.

## **6.7. BSA ve SAP'ın 100 kDa PES Membranda Etkin Difüzyon Katsayıları**

BSA ve SAP'ın farklı iyonik çevre koşullarında 100 kDa PES membranlardaki etkin difüzyon katsayıları (De) Bölüm 4.2.3'de anlatılan deney sisteminde elde edilen verilerin ve Bölüm 3.2'de verilen kütle korunum temelli model sonuçlarının uyumu ile belirlemiştir.

İyonik gerilimin artması ile BSA-membran ara yüzey etkileşimlerini azaldığı (Çizelge 5.10) için yüksek iyonik gerilimde kirlilik azalmış -benzer durum SAP'da da gözlenmiş- etkin difüzyon katsayısı artmıştır (Çizelge 5.17 ve 5.19). İyonik gerilimdeki artış gözenek içindeki çift tabaka kalınlığı azaltmış ve bunun sonucunda etkin gözenek çapının artması ile proteinin gözenek içinde hareket kısıtlaması azalmıştır. İzoelektrik noktanın altındaki pH değerinde adsorplanan protein miktarı fazla olduğu için etkin difüzyon katsayısı azalmış, kirliliğin en az olduğu izoelektrik noktada ise artmıştır.

Bu çalışmada, protein (BSA) ve enzimlerin (SAP) ultrafiltrasyon membranlara adsorpsiyonu, aralarındaki elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler ve membran yüzeyinde meydana gelen yapısal değişimler incelenerek çözelti ve membran özelliklerinin kirlilik mekanizmasına etkileri araştırılmıştır. Kirliliğin kantitatif ölçütü ise membran içinde kütle korunum temelli oluşturulan matematik modelin deney verileri ile uyumu sonucu hesaplanan etkin difüzyon katsayısı ( $D_e$ ) ile belirlenmiştir. Uygun deney tasarımları sonucu elde edilen verilerinin kullanımıyla bulunan  $D_e$ 'nin gözenekli ortamda çözelti ve membran özelliklerine bağlı olarak değişimi incelenmiş ve taşınım olaylarında önemli bir tasarım parametresi bulunmuştur.

Çapraz akış hızı, basınç ve sıcaklık gibi mühendislik parametrelerinin de ultrafiltrasyon ile ayırmada önemli bir sorun oluşturan membran kirliliği üzerine önemli etkileri vardır. Bu parametreler de göz önüne alınarak kirliliği etkileyen faktörler; membran materyalinin özellikleri, ayrılacak moleküllerin özellikleri ve işletme parametreleri olarak üç grup altında toplanabilir. Bu üç grup faktörün farklı kombinasyonlarının kirliliğe etkileri, model bir sistemde bu faktörler birbirinden bağımsız olarak çalışıldığı durumdakinden farklı olacaktır. Bu çalışmada moleküler seviyede yapılan incelemeler sonucu elde edilen bulguların sürekli sistemlerdeki kirlilik mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olacağı muhakkaktır.

## KAYNAKLAR

- Aimar, P., Baklouti, S. and Sanchez, V. 1986. Membrane-solute interaction: influence on pure solvent transport during ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 29207-224
- Alexov, E. 2004. Numerical calculations of the pH of maximal protein stability. *Eur. J. Biochem.*, 271, 173-185.
- Ariza, M.J., Canas, A., Banavente, J. 2001. Electrokinetic and electrochemical characterizations of porous membranes, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering*, 247-256.
- Atkinson, B., Mavituna, F., 1991. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. McMillan Publishers Ltd., Eng.
- Belfer, S., Fainchtain, R., Purinson, Y. and Kedem, O. 2000. Surface characterization by FTIR-ATR spectroscopy of polyethersulfone membranes-unmodified, modified and protein fouled, *Journal of Membrane Science*, 172, 113-124.
- Bhattacharjee, C., and Datta, S. 1997. A mass transfer model for the prediction of rejection and flux during UF of PEG-6000. *Journal of Membrane Science*, 125, 303-310.
- Birdi S.K. 1997. *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*, CRC Press, NY.
- Bowen, R.W., Pan, L., Sharif, A.O. 1998. Predicting equilibrium constants for ion exchange of proteins -a colloid science approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.* 143,117-131.
- Burns D. and Zydney A. 1999. Effect of solution pH on protein transport through ultrafiltration membranes. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(1), 27-37.
- Burns, D. and Zydney, A. 2000. Buffer effects on zeta potential of ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 172, 39-48
- Burns, D.B., Zydney A.L. 2001. ntribution to electrostatic interactions on protein transport in membrane systems. *AIChE J.*, 47, 1101-1113.
- Butterworth, J., Hemema, A. 1988. *Product Recovery in Bioprocess Technology*, p. 91-116, NY.
- Cheryan, M. 1998. *Ultrafiltration and microfiltration handbook*, Technomic Publishing Inc., Lancaster-Pennsylvania.
- Clark M.M and Lucas P. 1998. Diffusion and partitioning of humic acid in a porous ultrafiltration membrane, *Journal of Membrane Science*, 143, 13-25.
- Combe, C., Molis, E., Lukas, P., Riley, R., Clark, M.M. 1999. The effect of CA membrane properties on adsorptive fouling by humic acid, 154, 73-87.
- Crank, J. 1956, *The Mathematics of Diffusion* , Oxford University Press, London.
- Çalık P, Bilir E, Calik G, Özdamar, T.H. 2003 Bioreactor operation parameters as tools for metabolic regulations in fermentation processes: influence of pH conditions, *Chemical Engineering Science*, 58 (3-6): 759-766.
- Ernst, M., Bismarck, A., Springer, J. and Jekel, M. 2000. Zeta-potential and rejection rates of a polyethersulfone nanofiltration membrane in single salt solution. *Journal of Membrane Science*, 165, 251-259.
- Fane, A.G. and Radovich, J.M. 1990. *Separation Processes in Biotechnology*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Garcia, A., Bonen, M.R., Ramirez-Vick, J., Sadaka, M. and Vuppu A. 1999. *Bioseparation process science*. Blackwell Science, Massachusetts.

- Grasso, D., Subramaniam, K., Butkus, M., Strevett, K., Bergendahl, J. 2002. A review of non-DLVO interactions in environmental colloidal systems, *Re/Views in Environmental Science&Bio/Technology*, 1,17-38.
- Groß, A., Heintz A. Diffusion coefficient of aromatics in nonporous PEBA membranes, *Journal of Membrane Science*, 233-242, 2000
- Howell, J.A., Nyström, M. 1993. Fouling phenomena. *Membranes in bioprocessing: Theory and applications* (Ed: Howell, J.A, Sanchez, V. and Field, R.W.) Chapman & Hall, London.
- Huisman, I.H. and Trägårdh, G. 1999. Determining the zeta potential of ultrafiltration membranes using their salt retention. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 157, 261-268
- Huisman, I.H., Prádanos, P. and Hernández, A. 2000. The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 179,79-90 .
- Jones L.K. and O'Melia R.C. 2000. Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surface: effects of pH and ionic strength, *J Membr Sci* 165:31-46.
- Kalisz, M.M., 1988. *Microbial Proteinase*, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Fiecher, A.(Eds), Springer-Verlag, Berlin.
- Kelly S.T. and Zydney A. 1994. Effects of intermolecular thiol-disulfide interchange reaction on BSA fouling during Microfiltration, *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 972-982.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 1993. *Principles of Biochemistry* 2nd Edition, Worth Publishers Inc.,NY, 134-156.
- Leontidis, E., 2002. Hofmeister anion effects on surfactant self-assembly and the formation of mesoporous solids, *Current Opinion in Colloids and Interfaces Science*, 81-91.
- Lowry, O.H., Rosenbourg, N.T., Farr, A.,L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*,193, 265-275.
- Mark, F.M. and Othmer, D.F. 1983. *Encyclopedia of chemical technology* , 3<sup>rd</sup> ed., John Wiley & Sons, NY.
- Maruyama, T., Katoh S., Nakajima M. and Nabetani H. 2001. Mechanism of bovine serum albumin aggregation during ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 75 (2),233-238.
- Masselin I., Chasseray X., Chevalier M., Laine J. and Lemordant D. 2000. Determination of the porosity to thickness ratio  $A_k/\Delta x$  for UF and MF membranes by diffusion experiments, *Journal of Membrane Science*, 172, 125-133.
- Matthiasson, E., 1983. The role of macromolecular adsorption in fouling of ultrafiltration membranes. *J Membr. Sci.*, 16, 23-36.
- Menon, M.K. and Zydney, A. 2001. Protein charge ladders: a new technique for studying electrostatic interactions in ultrafiltration systems. *Journal of Membrane Science*, 181,179-184.
- Menon, M.K., Zydney, A.L. 1999. Effect of ion binding on protein transport through ultrafiltration membranes. *Biotechnol. Bioeng.*, 63, 298-307.

- Möckel, D., Staude, E. and Guiver, M.D. 1999. Static protein adsorption behavior and cleanability of hydrophilized polysulfone membranes. *Journal of Membrane Science*, 158, 63-75.
- Mulder, M. 1992. *Basic Principles of Membrane Technology*. Kluwer Academic Publishers, NY.
- Nakamura K. and Matsumo K. 1998. Adsorption behavior of BSA in microfiltration with porous glass membrane, *Journal of membrane Science*, 145, 119-128.
- Norde W. and Giacomelli E.C. 2000. BSA Structural Changes During Homomolecular Exchange Between the Adsorbed and the Dissolved States, *Journal of Biotechnology*, 79, 259-268.
- Nyström, M., Pihlajamäki, A., Ehsani N. 1994. Characterization of ultrafiltration membranes by simultaneous streaming potential and flux measurements, *Journal of Membrane Science*, 87, 245-256.
- O'sullivan, T.J., Epstein, S.R., Korchin, S.R. and Beaton, N.C. 1984. Application of ultrafiltration in biotechnology. *Chemical Engineering Progress*, 68-73.
- Pihlajamäki, A., Väisänen, P. and Nyström, M. 1998. Characterization of clean and fouled polymeric ultrafiltration membranes by fourier transform IR spectroscopy-attenuated total reflection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 138,323-333.
- Ricq, L., Pierre, A., Bayle, S. and Reggiani, J. 1999. Electrokinetic characterization of polyethersulfone UF membranes. *Desalination*, 109, 253-261.
- Schaep J. and Vandecasteele, C. 2001. Evaluating the charge of nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 188,129-136.
- Shao J. and Baltus R.E. 2000. Effect of solute concentration on hindered diffusion in porous membranes, 46(7), 1307-1316.
- Shiloach, J., Martin, N., Moes, H. 1988. Tangential flow filtration. *Downstream Processes: Equipment and Techniques*, 97-125.
- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, R.I., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A. 1983. General Structural Design. Amino acids and Peptides. *In Principles of Biochemistry: General Aspects*, 7<sup>th</sup> Ed., McGraw-Hill, Singapore, 23-42.
- Sthramann, H., 2001. Membrane separation processes: Current relevance and future opportunities, *AIChE Journal*, 47(5), 1077-1087.
- Wang W., Combe C. and Clark M.M. 2001. The effects of pH and calcium on the diffusion coefficient of humic acid, *Journal of Membrane Science*, 183, 49-60.
- Xu, T., Rongqiang, F., Lifeng,Y. 2003. A new insight into the adsorption of bovine serum albumin onto porous polyethylene membrane by zeta potential measurements, FTIR analyses, and AFM observations. *J Colloid Interface Sci.*, 262, 342-350.
- Yoon, J., Kim, J. and Kim, W. 1999. The relationship of interaction forces in protein adsorption onto polymeric microspheres. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 153, 413-419.
- Zydney A.L. and Pujar, N.S. 1998. Protein transport porous membranes: effects of colloidal interactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.*, 138,133-143.
- <http://www.biochem.usyd.edu.au>.
- <http://www.brenda.uni-koeln.de>

## E K L E R

- EK 1 Etkin difüzyon katsayısının bulunmasına yönelik kurulan denklemin değişkenlerine ayırma yöntemi ile çözümü
- EK 2 Membrana adsoplanan protein miktarının bulunması için örnek hesaplama
- EK 3 Etkin difüzyon katsayısının bulunması deneyleri için BSA ve SAP derişim kalibrasyonları
- EK 4 Adsorpsiyon deneyleri için BSA ve SAP derişim kalibrasyonları
- EK 5 Lowry yöntemi ile protein derişim kalibrasyonu
- EK 6 Etkin difüzyon katsayısının bulunmasına yönelik kurulan denklemin çözümünde döngü sayısının belirlenmesi
- EK 7 BSA için farklı iyonik çevrelerde etkin difüzyon katsayıları
- EK 8 SAP için farklı iyonik çevrelerde etkin difüzyon katsayıları

## EK 1 ETKİN DİFÜZYON KATSAYISININ BULUNMASINA YÖNELİK KURULAN DENKLEMİN DEĞİŞKENLERİNE AYIRMA YÖNTEMİ İLE ÇÖZÜMÜ

Membran içinde alınan hacim elemanında kurulan kütle korunum denklemi Eş.1'deki gibi düzenlenmiş, yatışkın olmayan koşuldaki kısmi türevli diferansiyel denklemin değişkenlerine ayırma yöntemi ile yapılan analitik çözümü için izlenen yol aşağıda verilmiştir.

$$D_e \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} = \frac{\partial C}{\partial t} \quad (1)$$

Eş.1'in çözümü için başlangıç ve sınır koşulları;

$$t = 0 \quad C = 0 \quad (2)$$

$$y = 0 \quad C = C_1 \quad (3)$$

$$y = h \quad C = C_2 \quad (4)$$

Değişkenlerine ayırma yönteminin uygulanabilmesi için başlangıç ve sınır koşullarının yeniden düzenlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla değişken değiştirme işlemi yapılmıştır (Eş.5).

$$\theta = (C_1 - C) + (C_2 - C_1) \frac{y}{h} \quad (5)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial C}{\partial \theta} \frac{\partial \theta}{\partial t} = - \frac{\partial C}{\partial t} \quad (6)$$

$$\frac{\partial^2 C}{\partial y^2} = \frac{\partial}{\partial y} \left( \frac{\partial C}{\partial y} \right) = \frac{\partial}{\partial y} \left( \frac{\partial C}{\partial \theta} \frac{\partial \theta}{\partial y} \right) = \frac{\partial}{\partial y} \left( - \frac{\partial \theta}{\partial y} \right) = - \frac{\partial C}{\partial t} \quad (7)$$

EK 1 (Devam)

Buna göre Eş.1 düzenlenirse Eş.8 elde edilir.

$$D_e \frac{\partial^2 \theta}{\partial y^2} = \frac{\partial \theta}{\partial t} \quad (8)$$

Eş.2 ile verilen başlangıç koşulu, Eş. 3 ve 4 ile verilen sınır koşulları Eş.5 yardımı ile düzenlenirse; sırasıyla, Eş. 9, 10 ve 11 elde edilir.

$$t = 0 \quad \theta = C_1 + (C_2 - C_1) \frac{y}{h} \quad (9)$$

$$y = 0 \quad \theta = 0 \quad (10)$$

$$y = h \quad \theta = 0 \quad (11)$$

Eş.8'de  $\theta$  konum ve zamanın fonksiyonudur; bağımlı değişken  $\theta$ , bağımsız değişkenler ise  $y$  ve  $t$ 'dir. Eş.8 değişkenlerine ayrılırsa Eş.12 elde edilir. Eş.12'nin  $y$ 'ye göre ikinci,  $t$ 'ye göre birinci türevi alınarak düzenlenirse Eş.15 elde edilir.

$$\theta = F(y)G(t) \quad (12)$$

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = F \frac{dG}{dt} \quad (13)$$

$$\frac{\partial^2 \theta}{\partial y^2} = \frac{\partial}{\partial y} \left( \frac{\partial \theta}{\partial y} \right) = \frac{\partial}{\partial y} \left( G \frac{\partial F}{\partial y} \right) = G \frac{\partial^2 F}{\partial y^2} \quad (14)$$

$$D_e G \frac{\partial^2 F}{\partial y^2} = F \frac{\partial G}{\partial t} \quad (15)$$

Eş. 15'in bir tarafı  $y$ 'nin diğer tarafı ise  $t$ 'nin fonksiyonudur. Eş. 15'in her iki tarafı  $-\lambda^2$  gibi bir sabite eşitlenir.

EK 1 (Devam)

$$\frac{1}{F} \frac{d^2 F}{dy^2} = \frac{1}{D_e G} \frac{dG}{dt} = -\lambda^2 \quad (16)$$

• **I. Durum,**

$$\frac{1}{D_e G} \frac{dG}{dt} = -\lambda^2 \quad (17)$$

$$\frac{dG}{G} = -\lambda^2 D_e dt \quad (18)$$

$$\ln G = -\lambda^2 D_e t + \ln A_1 \quad (19)$$

$$G = A_1 e^{(-\lambda^2 D_e t)} \quad (20)$$

• **II. Durum,**

$$\frac{1}{F} \frac{d^2 F}{dy^2} = -\lambda^2 \quad (21)$$

$$\frac{d^2 F}{dy^2} + \lambda^2 F = 0 \quad (22)$$

Eş.22'nin genel çözümünden Eş.23 elde edilir.

$$F = A_2 \sin(\lambda y) + A_3 \cos(\lambda y) \quad (23)$$

Eş.23'de yer alan  $A_2$  ve  $A_3$  sabitleri Eş.10 ve 11'deki sınır koşulları yardımı ile çözülür. Eş.10'da verilen sınır koşulu ( $y=0$  için  $\theta=0$ ) Eş.23'de yerine konursa  $A_3 = 0$  bulunur ve Eş. 23, Eş. 24'e indirgenir.

$$F = A_2 \sin(\lambda y) \quad (24)$$

EK 1 (Devam)

Eş.11'de verilen sınır koşulu ( $y = h$  için  $\theta = 0$ ) Eş.24'e uygulanırsa ;

$$0 = A_2 \sin(\lambda h) \quad (25)$$

$A_2 \neq 0$  olacağından  $\sin(\lambda h) = 0$  koşulunun sağlanması gerekir. Burada;

$$\lambda h = n\pi, \quad n = 0, 1, 2, 3, \dots \quad (26)$$

$$\lambda = \frac{n\pi}{h} \quad (27)$$

$$F = A_2 \sin\left(\frac{n\pi}{h} y\right) \quad (28)$$

Eş.20 ve 28, Eş.12 ile verilen değişkenlere ayırma yöntemi genel çözümünde yerine konulursa Eş.29 elde edilir.

$$\theta = A_2 \sin\left(\frac{n\pi}{h} y\right) * A_1 e^{\left(-\frac{n^2 \pi^2}{h^2} D_e t\right)} \quad (29)$$

Eş.29 seriler şeklinde ifade edilirse Eş.30 elde edilir.

$$\theta = \sum_{n=0}^{\infty} A_n \sin\left(\frac{n\pi}{h} y\right) e^{\left(-\frac{n^2 \pi^2}{h^2} D_e t\right)} \quad (30)$$

Eş.9 ile verilen başlangıç koşulu Eş. 30'a uygulanırsa Eş.31 elde edilir;

$$C_1 + (C_2 - C_1) \frac{y}{h} = \sum_{n=0}^{\infty} A_n \sin\left(\frac{n\pi}{h} y\right) \quad (31)$$

EK 1 (Devam)

Eş.31'in aşağıdaki şekilde integrali alınır;

$$\int_0^h \left( C_1 + (C_2 - C_1) \frac{y}{h} \right) \text{Sin} \left( \frac{m\pi}{h} y \right) dy = \int_0^h \sum_{n=0}^{\infty} A_n \text{Sin} \left( \frac{n\pi}{h} y \right) \text{Sin} \left( \frac{m\pi}{h} y \right) dy \quad (32)$$

$$\int_0^h \left( C_1 + (C_2 - C_1) \frac{y}{h} \right) \text{Sin} \left( \frac{m\pi}{h} y \right) dy = A_n \int_0^h \text{Sin}^2 \left( \frac{m\pi}{h} y \right) dy \quad (33)$$

$$C_1 \int_0^h \text{Sin} \left( \frac{m\pi}{h} y \right) dy + \frac{(C_2 - C_1)}{h} \int_0^h y \text{Sin} \left( \frac{m\pi}{h} y \right) dy = A_n \int_0^h \text{Sin}^2 \left( \frac{m\pi}{h} y \right) dy \quad (34)$$

$$\begin{aligned} & -C_1 \frac{1}{\frac{m\pi}{h}} \text{Cos} \left( \frac{m\pi}{h} y \right) \Bigg|_0^h + \frac{(C_2 - C_1)}{h} \left[ -y \frac{\text{Cos} \left( \frac{m\pi}{h} y \right)}{\frac{m\pi}{h}} + \frac{\text{Sin} \left( \frac{m\pi}{h} y \right)}{\left( \frac{m\pi}{h} \right)^2} \right] \Bigg|_0^h \\ & \dots \dots \dots = A_n \left[ -\frac{\text{Sin} \left( \frac{2m\pi}{h} y \right)}{\frac{4m\pi}{h}} + \frac{y}{2} \right] \Bigg|_0^h \end{aligned} \quad (35)$$

$$\begin{aligned} & \left[ \left( -C_1 \frac{1}{\frac{m\pi}{h}} \text{Cos} \left( \frac{m\pi}{h} h \right) \right) - \left( -C_1 \frac{1}{\frac{m\pi}{h}} \text{Cos} \left( \frac{m\pi}{h} 0 \right) \right) \right] \\ & + \frac{(C_2 - C_1)}{h} \left[ \left( -h \frac{\text{Cos} \left( \frac{m\pi}{h} h \right)}{\frac{m\pi}{h}} + \frac{\text{Sin} \left( \frac{m\pi}{h} h \right)}{\left( \frac{m\pi}{h} \right)^2} \right) - \left( -0 \frac{\text{Cos} \left( \frac{m\pi}{h} 0 \right)}{\frac{m\pi}{h}} + \frac{\text{Sin} \left( \frac{m\pi}{h} 0 \right)}{\left( \frac{m\pi}{h} \right)^2} \right) \right] \\ & = A_n \left[ \left( -\frac{\text{Sin} \left( \frac{2m\pi}{h} h \right)}{\frac{4m\pi}{h}} + \frac{h}{2} \right) - \left( -\frac{\text{Sin} \left( \frac{2m\pi}{h} 0 \right)}{\frac{4m\pi}{h}} + \frac{0}{2} \right) \right] \end{aligned} \quad (36)$$

EK 1 (Devam)

$$\left[ \left( -C_1 \frac{1}{\frac{m\pi}{h}} \text{Cos}(m\pi) \right) - C_1 \frac{1}{\frac{m\pi}{h}} \right] + \frac{(C_2 - C_1)}{h} \left[ \left( -h \frac{\text{Cos}(m\pi)}{\frac{m\pi}{h}} + 0 \right) - (-0 + 0) \right] \quad (37)$$

..... =  $A_n \left[ \left( 0 + \frac{h}{2} \right) - (-0 + 0) \right]$

$$-C_1 \frac{h}{m\pi} [\text{Cos}(m\pi) + 1] + (C_2 - C_1) \frac{h}{m\pi} (-\text{Cos}(m\pi)) = A_n \frac{h}{2} \quad (38)$$

$$\frac{h}{m\pi} [-C_1 \text{Cos}(m\pi) + C_1 - C_2 \text{Cos}(m\pi) + C_1 \text{Cos}(m\pi)] = A_n \frac{h}{2} \quad (39)$$

$$\frac{h}{m\pi} [+C_1 - C_2 \text{Cos}(m\pi)] = A_n \frac{h}{2} \quad (40)$$

$$A_n = \frac{2}{\pi} \frac{(C_1 - C_2 \text{Cos}(m\pi))}{m} \quad (41)$$

Eş.41 Eş. 30'da yerine yazılırsa Eş.42 elde edilir.

$$\theta = \sum_{m=1}^{\infty} \frac{2}{\pi} \frac{(C_1 - C_2 \text{Cos}(m\pi))}{m} \text{Sin}\left(\frac{n\pi}{h} y\right) e^{\left(\frac{-n^2\pi^2}{h^2} D_e t\right)} \quad (42)$$

$$\theta = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2}{\pi} \frac{(C_1 - C_2 \text{Cos}(n\pi))}{n} \text{Sin}\left(\frac{n\pi}{h} y\right) e^{\left(\frac{-n^2\pi^2}{h^2} D_e t\right)} \quad (43)$$

Eş.5, Eş. 43'de yerine yazılır ve düzenlenirse Eş. 44 elde edilir;

$$(C_1 - C) + (C_2 - C_1) \frac{y}{h} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2}{\pi} \frac{(C_1 - C_2 \text{Cos}(n\pi))}{n} \text{Sin}\left(\frac{n\pi}{h} y\right) e^{\left(\frac{-n^2\pi^2}{h^2} D_e t\right)} \quad (44)$$

EK 1 (Devam)

Eş.44 düzenlenerek Eş.1’de verilen denklemin genel çözümü Eş.45 ile elde edilir.

$$C = C_1 + (C_2 - C_1) \frac{y}{h} + \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(C_2 \cos(n\pi) - C_1)}{n} \sin\left(\frac{n\pi}{h} y\right) e^{\left(-\frac{n^2 \pi^2}{h^2} D_e t\right)} \quad (45)$$

## EK 2 MEMBRANA ADSOPLANAN PROTEİN MİKTARININ BULUNMASI İÇİN ÖRNEK HESAPLAMA

Membrana adsorplanan protein miktarı, başlangıç protein derişimi ile dengedeki sıvı faz protein derişimi arasındaki farkın toplam çözeltili hacmi ile çarpılıp membran kütlelerine bölünmesiyle elde edilmiştir (Eş. 1).

$$q = (C_0 - C^*) \times \frac{V_{\text{çözeltili}}}{m_{\text{membran}}} \quad (1)$$

### Örnek hesaplama:

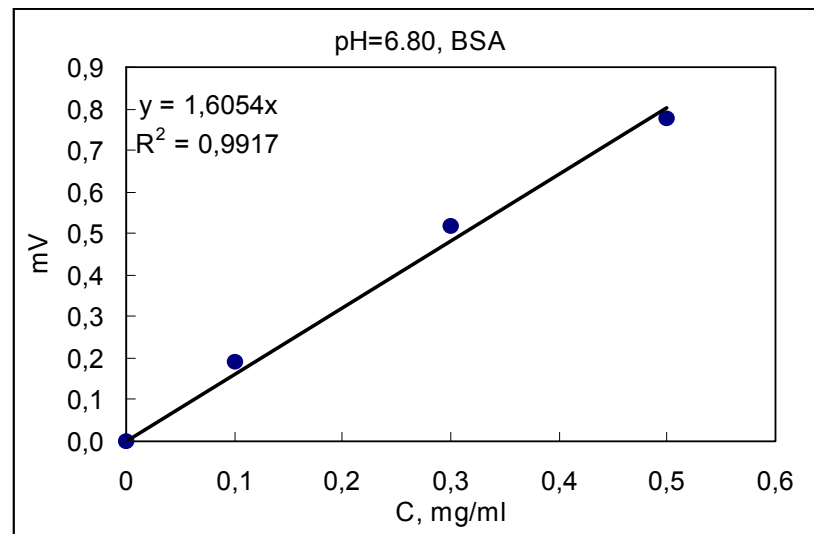
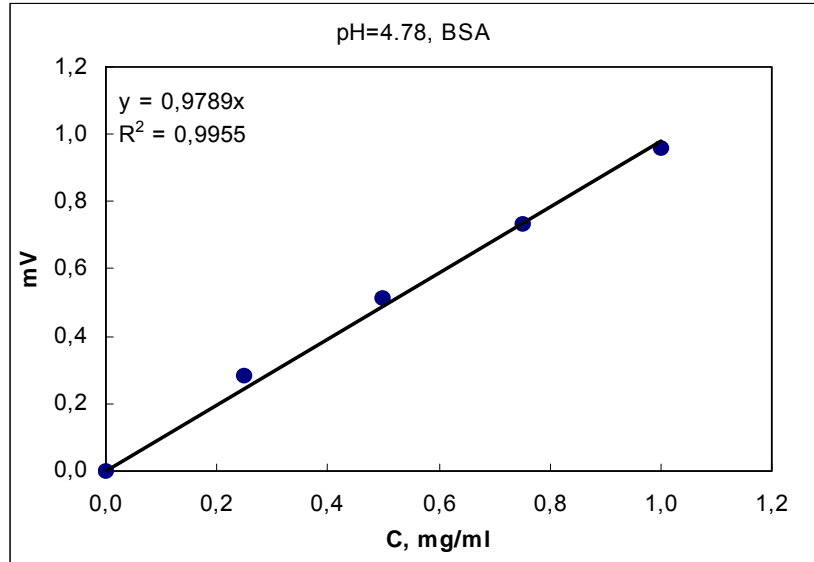
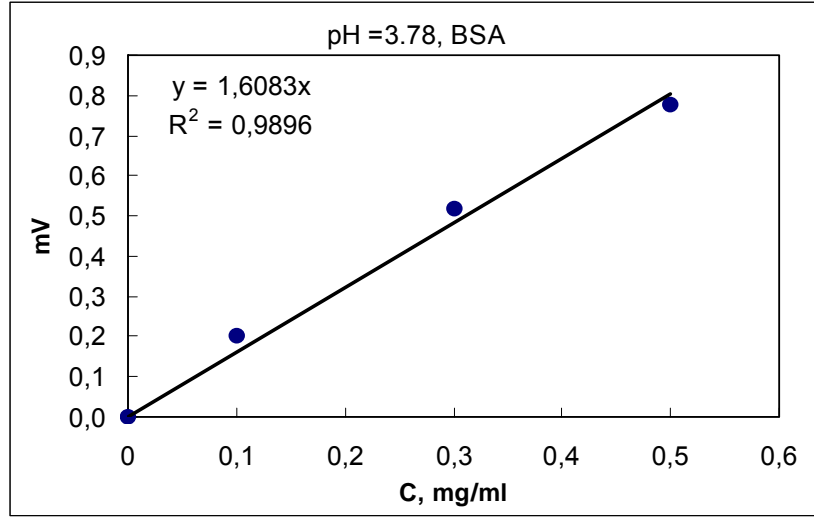
pH=6.80 ve 0.01 M KCL koşullarında  $C_0=1.5$  mg/ml derişimindeki BSA adsorpsiyonu sonucu membrana adsorplanan madde miktarı:

$$q = (1,533 - 1,513) \text{mg} / \text{ml} \times \frac{100 \text{ml}}{0,044 \text{g}}$$

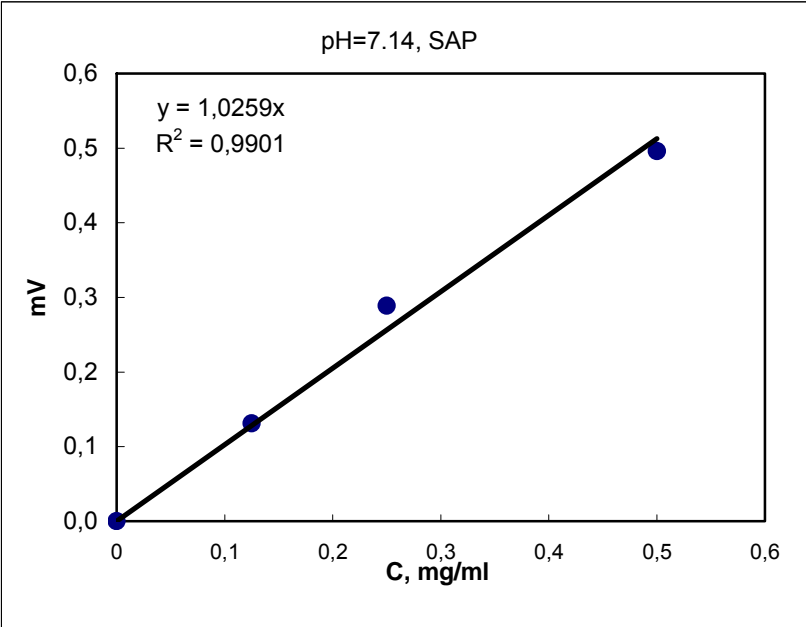
$$q = 45,45 \text{mgprotein} / \text{gmembran}$$

### EK 3 ETKİN DİFÜZYON KATSAYISININ BULUNMASI DENEYLERİ İÇİN

#### BSA ve SAP DERİŞİM KALİBRASYONLARI

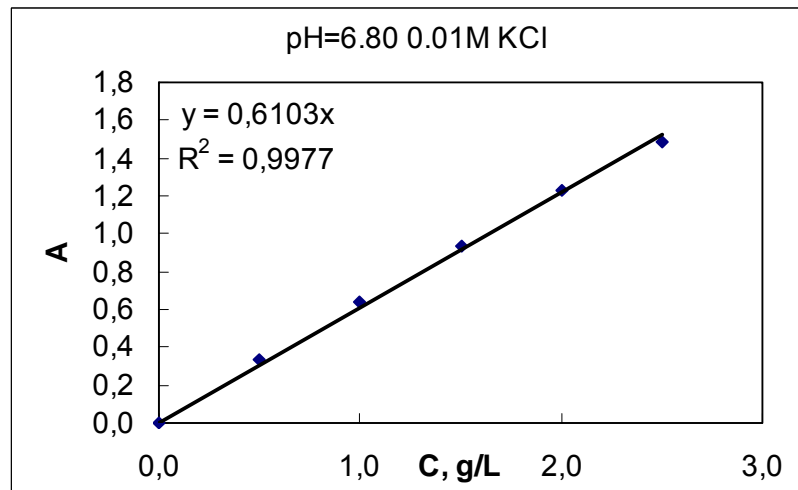
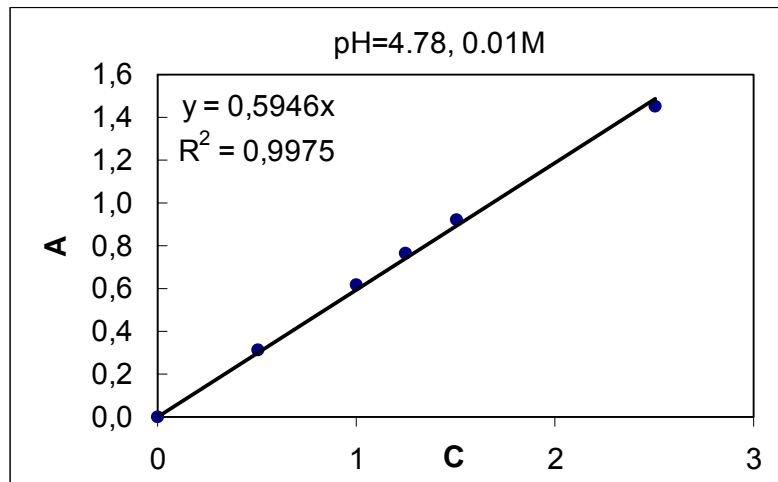
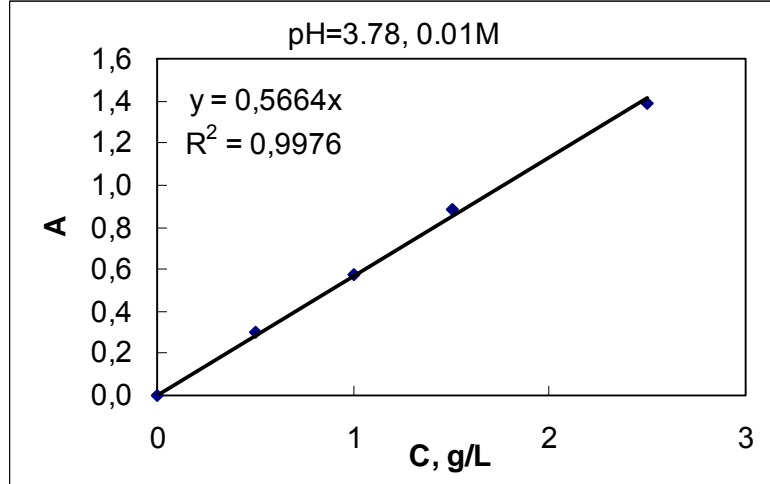


EK 3 (Devam)



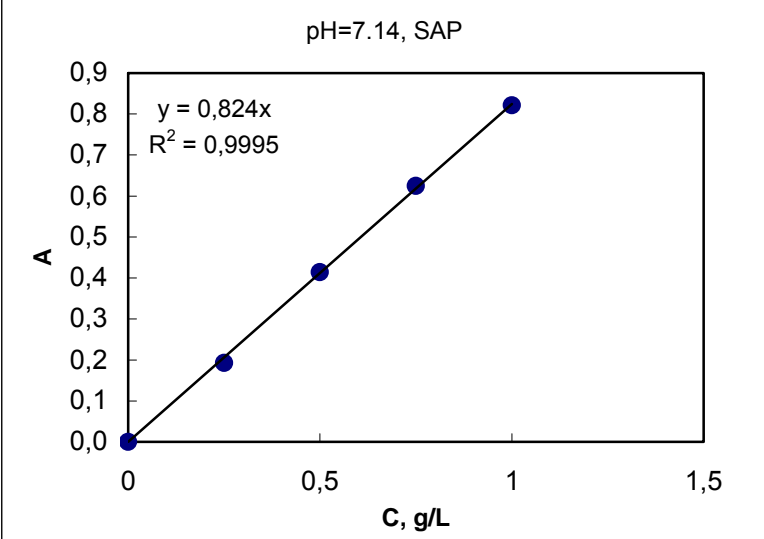
## EK 4 ADSORPSİYON DENEYLERİ İÇİN BSA VE SAP DERİŞİM KALİBRASYONLARI

### A) BSA

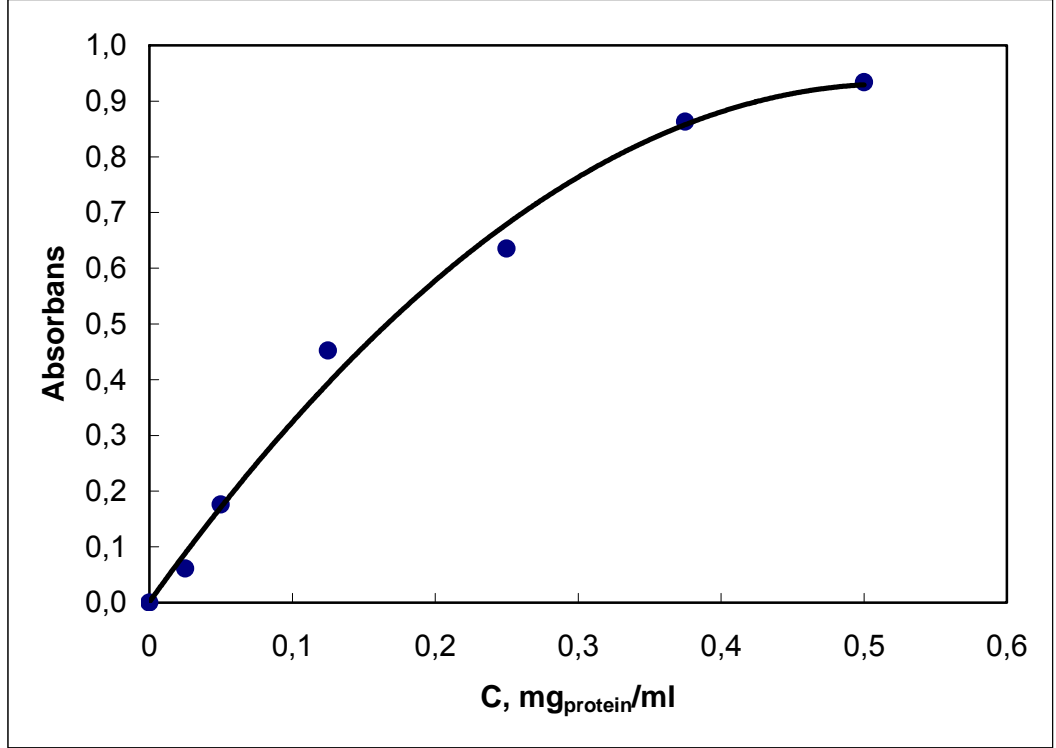


EK 4 (Devam)

**B) SAP**



## EK 5 LOWRY YÖNTEMİ İLE PROTEİN DERİŞİM KALİBRASYONU



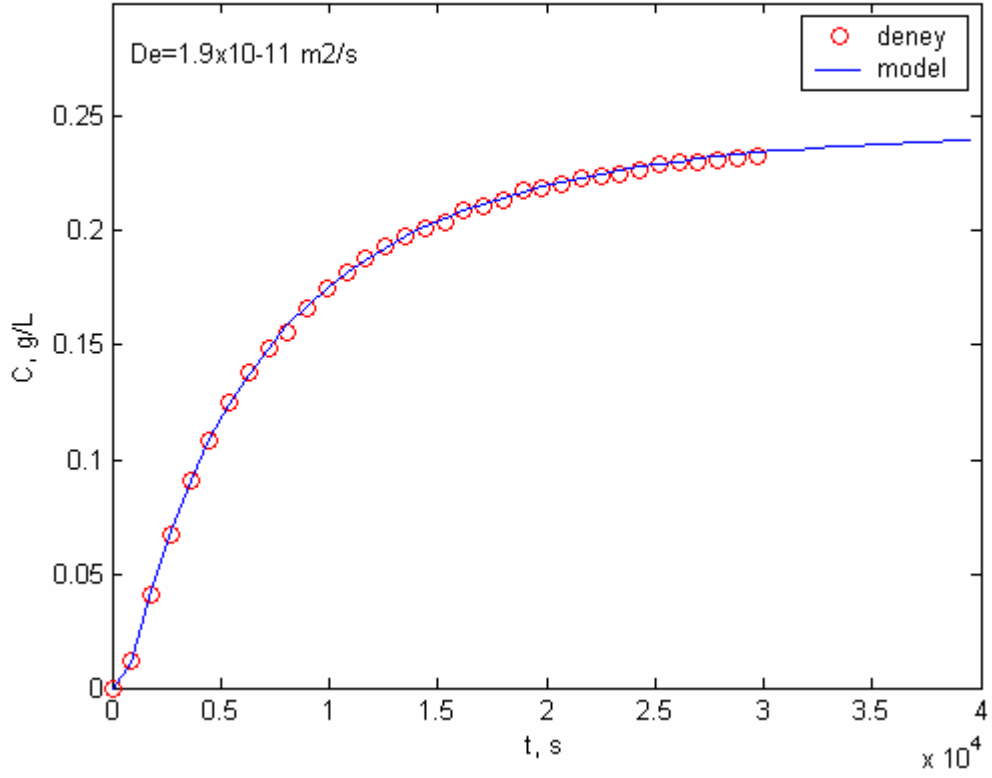
**EK 6 ETKİN DİFÜZYON KATSAYISININ BULUNMASINA YÖNELİK KURULAN DENKLEMİN ÇÖZÜMÜNDE DÖNGÜ SAYISININ BELİRLENMESİ**

Cdeney	Cmodel	Cmodel	Cmodel	Cmodel	Cmodel	Cmodel	Cmodel	Cmodel	Cmodel
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=10	n=20	n=100
0,0000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,000</b>	0,000	0,000	0,000	0,000
0,0250	0,028	0,026	0,025	0,024	<b>0,024</b>	0,024	0,024	0,024	0,024
0,0540	0,058	0,057	0,056	0,055	<b>0,055</b>	0,055	0,055	0,055	0,055
0,0810	0,083	0,082	0,081	0,081	<b>0,080</b>	0,080	0,080	0,080	0,080
0,1020	0,103	0,102	0,102	0,101	<b>0,101</b>	0,101	0,101	0,101	0,101
0,1170	0,120	0,120	0,119	0,119	<b>0,119</b>	0,119	0,119	0,119	0,119
0,1320	0,135	0,134	0,134	0,134	<b>0,133</b>	0,133	0,133	0,133	0,133
0,1470	0,147	0,147	0,146	0,146	<b>0,146</b>	0,146	0,146	0,146	0,146
0,1560	0,158	0,158	0,157	0,157	<b>0,157</b>	0,157	0,157	0,157	0,157
0,1650	0,167	0,167	0,167	0,167	<b>0,166</b>	0,166	0,166	0,166	0,166
0,1730	0,176	0,175	0,175	0,175	<b>0,175</b>	0,175	0,175	0,174	0,174
0,1790	0,183	0,182	0,182	0,182	<b>0,182</b>	0,182	0,182	0,182	0,182
0,1870	0,189	0,189	0,188	0,188	<b>0,188</b>	0,188	0,188	0,188	0,188
0,1910	0,195	0,194	0,194	0,194	<b>0,194</b>	0,194	0,194	0,194	0,194
0,1980	0,200	0,199	0,199	0,199	<b>0,199</b>	0,199	0,199	0,199	0,199
0,2040	0,204	0,204	0,204	0,204	<b>0,204</b>	0,203	0,203	0,203	0,203
0,2090	0,208	0,208	0,208	0,208	<b>0,208</b>	0,207	0,207	0,207	0,207
0,2110	0,211	0,211	0,211	0,211	<b>0,211</b>	0,211	0,211	0,211	0,211
0,2150	0,215	0,215	0,214	0,214	<b>0,214</b>	0,214	0,214	0,214	0,214
0,2170	0,218	0,217	0,217	0,217	<b>0,217</b>	0,217	0,217	0,217	0,217
0,2190	0,220	0,220	0,220	0,220	<b>0,220</b>	0,220	0,220	0,220	0,220
0,2220	0,223	0,222	0,222	0,222	<b>0,222</b>	0,222	0,222	0,222	0,222
0,2240	0,225	0,225	0,224	0,224	<b>0,224</b>	0,224	0,224	0,224	0,224
0,2250	0,227	0,226	0,226	0,226	<b>0,226</b>	0,226	0,226	0,226	0,226
0,2280	0,228	0,228	0,228	0,228	<b>0,228</b>	0,228	0,228	0,228	0,228
0,2290	0,230	0,230	0,230	0,230	<b>0,230</b>	0,230	0,230	0,230	0,230
0,2300	0,231	0,231	0,231	0,231	<b>0,231</b>	0,231	0,231	0,231	0,231
0,2320	0,233	0,233	0,233	0,233	<b>0,233</b>	0,232	0,232	0,232	0,232
0,2330	0,234	0,234	0,234	0,234	<b>0,234</b>	0,234	0,234	0,234	0,234
0,2350	0,235	0,235	0,235	0,235	<b>0,235</b>	0,235	0,235	0,235	0,235
0,2350	0,236	0,236	0,236	0,236	<b>0,236</b>	0,236	0,236	0,236	0,236
0,2370	0,237	0,237	0,237	0,237	<b>0,237</b>	0,237	0,237	0,237	0,237
0,2390	0,238	0,238	0,238	0,238	<b>0,238</b>	0,238	0,238	0,238	0,238
0,2390	0,238	0,238	0,238	0,238	<b>0,238</b>	0,238	0,238	0,238	0,238
0,2400	0,239	0,239	0,239	0,239	<b>0,239</b>	0,239	0,239	0,239	0,239

## EK 7 BSA İÇİN FARKLI İYONİK ÇEVRELERDE ETKİN DİFÜZYON

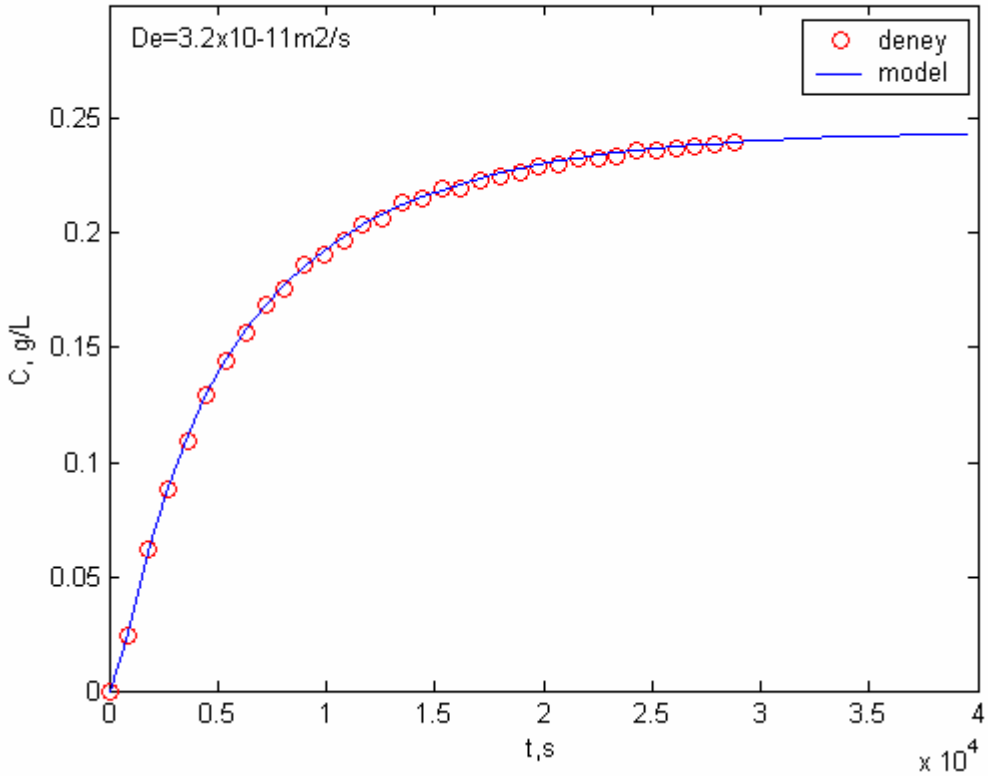
### KATSAYILARI

- BSA, pH=3.78, 0.01M KCl , Co=0.5g/L  
De=1.9e-11m<sup>2</sup>/s;



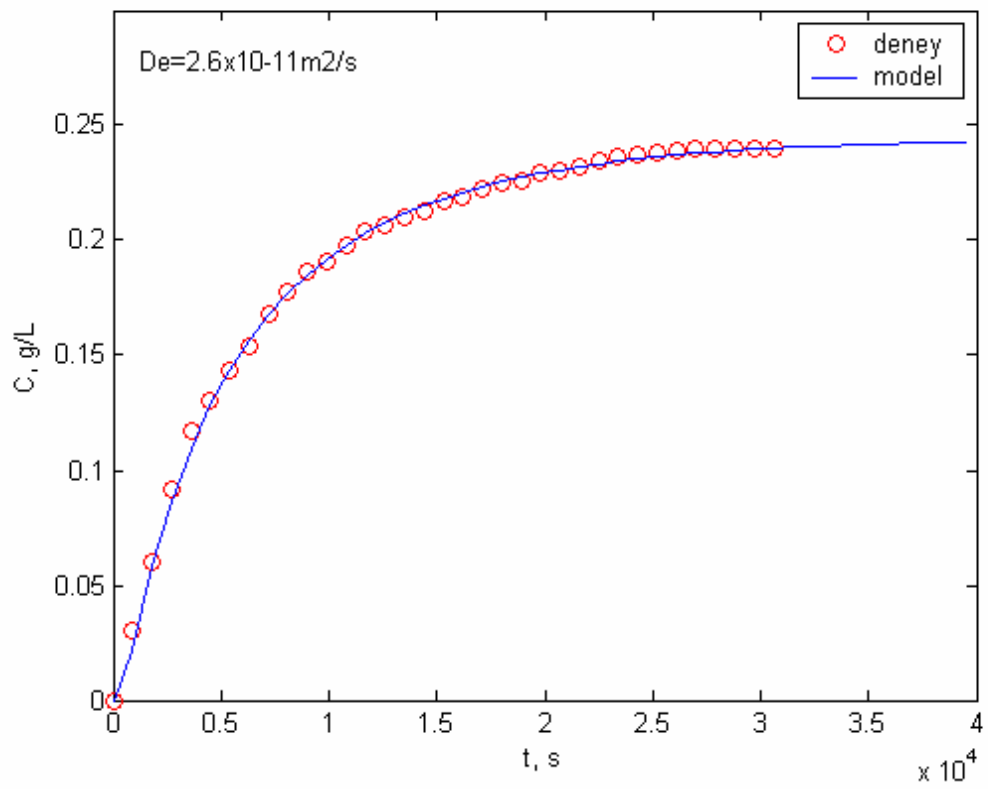
EK 7 (Devam)

- BSA, pH=6.80, 0.01M KCl , Co=0.5g/L  
De=3.2e-11 m<sup>2</sup>/s,



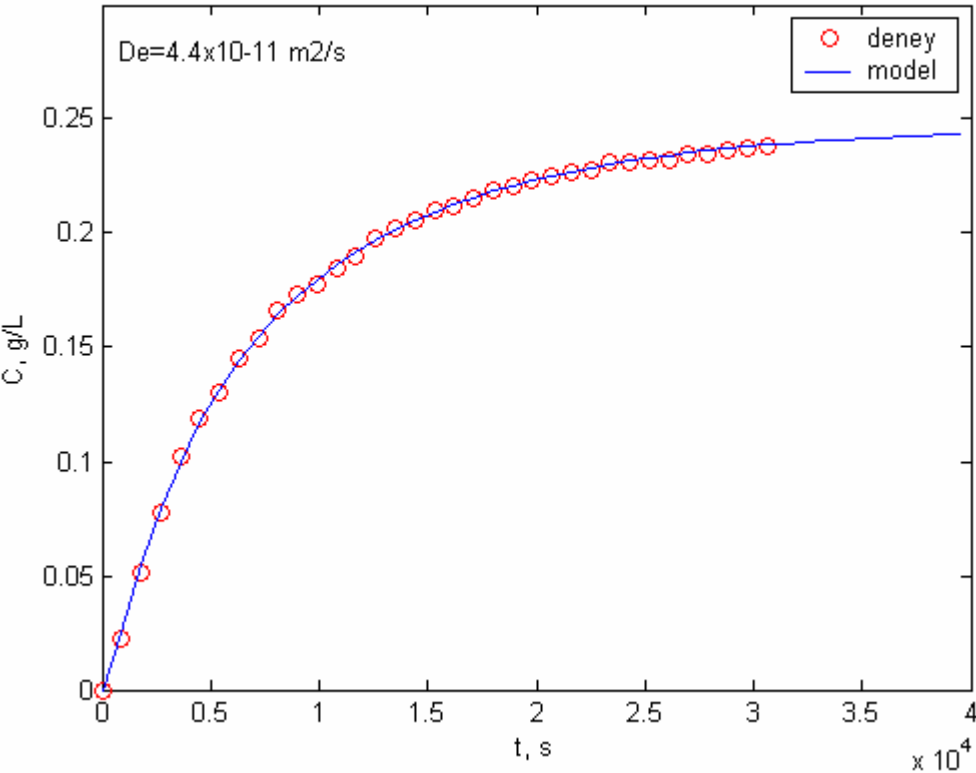
EK 7 (Devam)

- BSA, pH=3.78, 0.1M KCl,  $C_0=0,5$  g/L  
 $De=2.6e-11$  m<sup>2</sup>/s



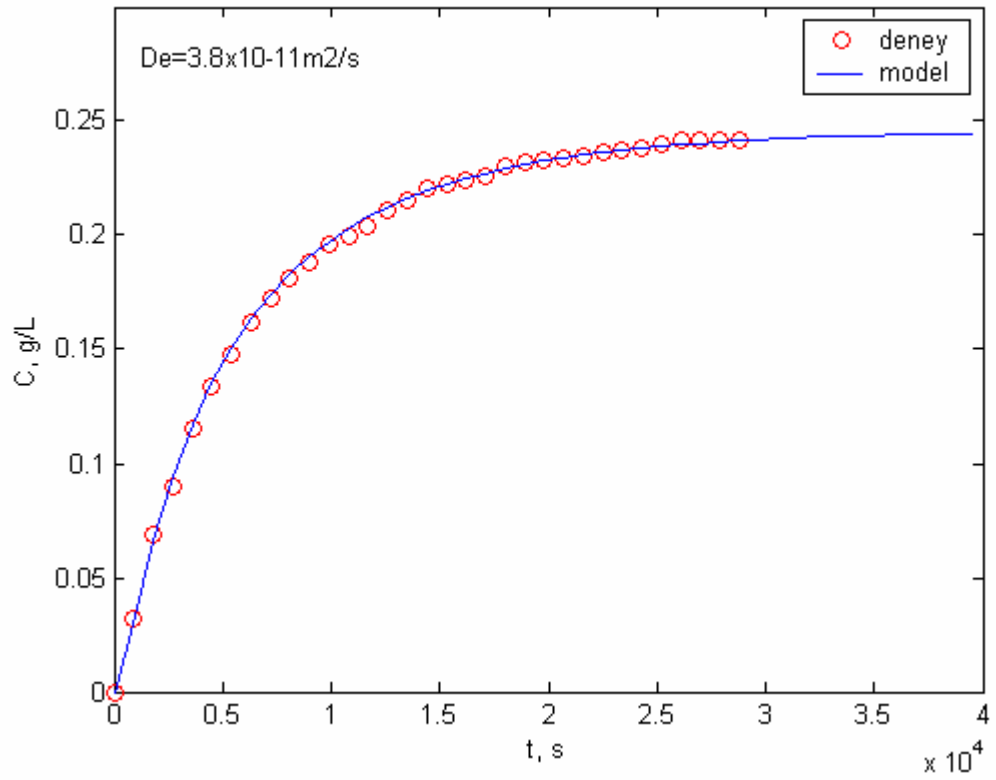
EK 7 (Devam)

- BSA, pH=4.78, 0.1M KCl, Co=0,5 g/L  
De=4.4e-11 m<sup>2</sup>/s;



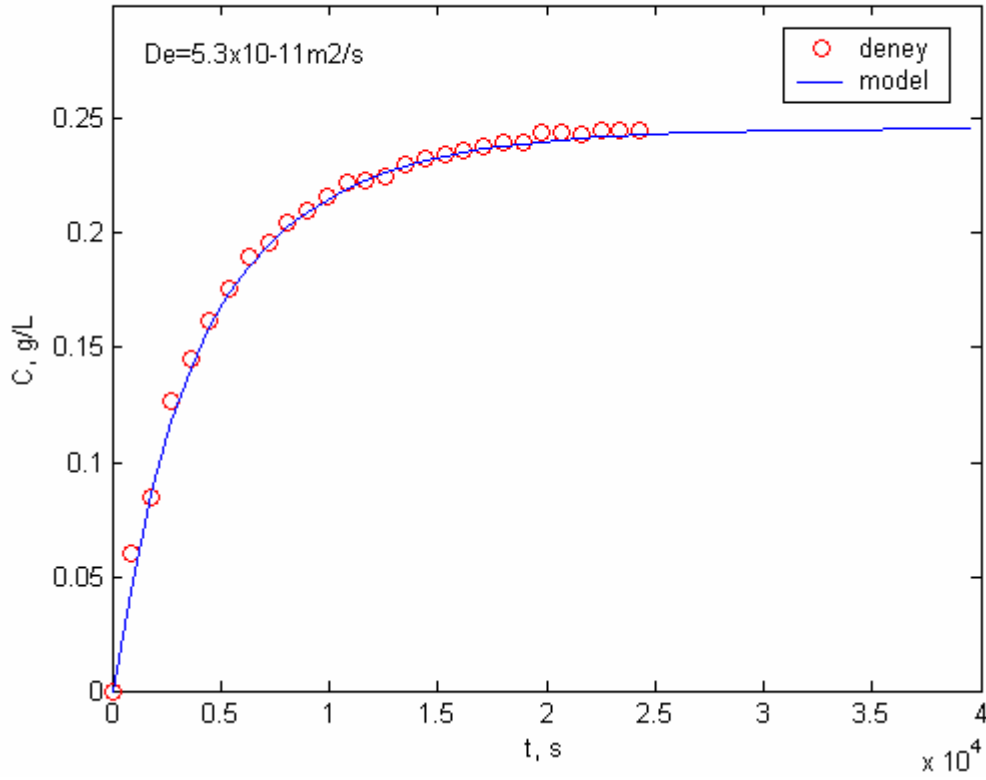
EK 7 (Devam)

- BSA, pH=6.80, 0.1M KCl,  $C_0=0.5\text{g/L}$   
 $De=3.8\text{e-}11\text{ m}^2/\text{s}$



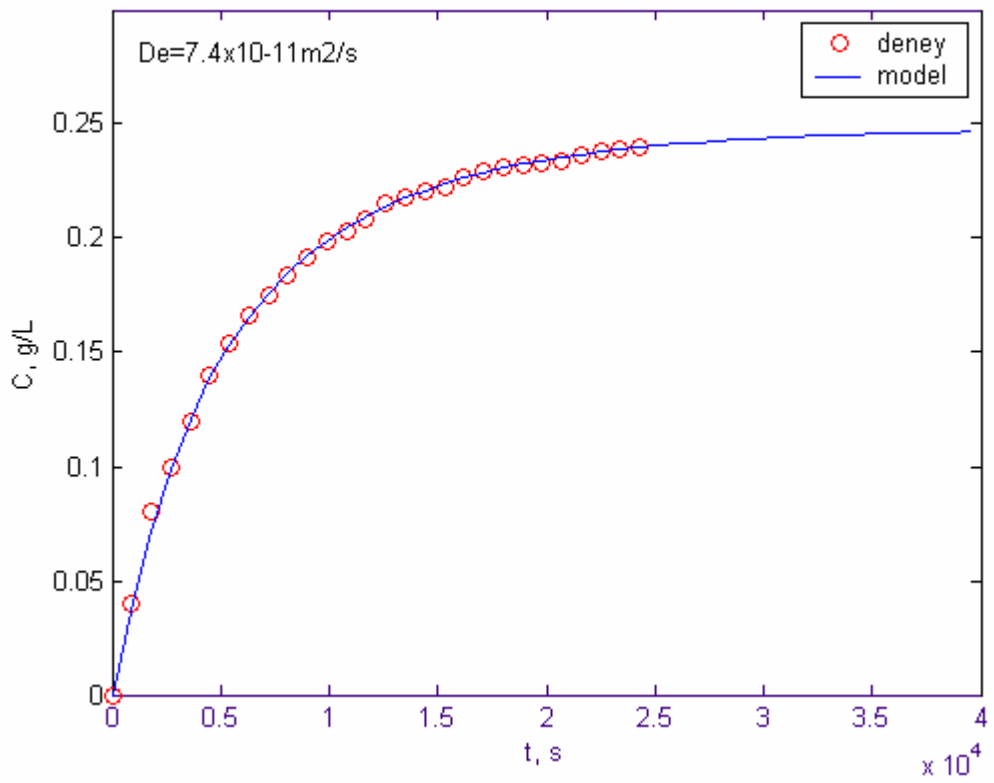
## EK 8 SAP İÇİN FARKLI İYONİK ÇEVRELERDE ETKİN DİFÜZYON KATSAYILARI

- SAP, pH=7.14,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $C_0=0.5 \text{ g/L}$   
 $De=5.3\text{e-}11 \text{ m}^2/\text{s}$



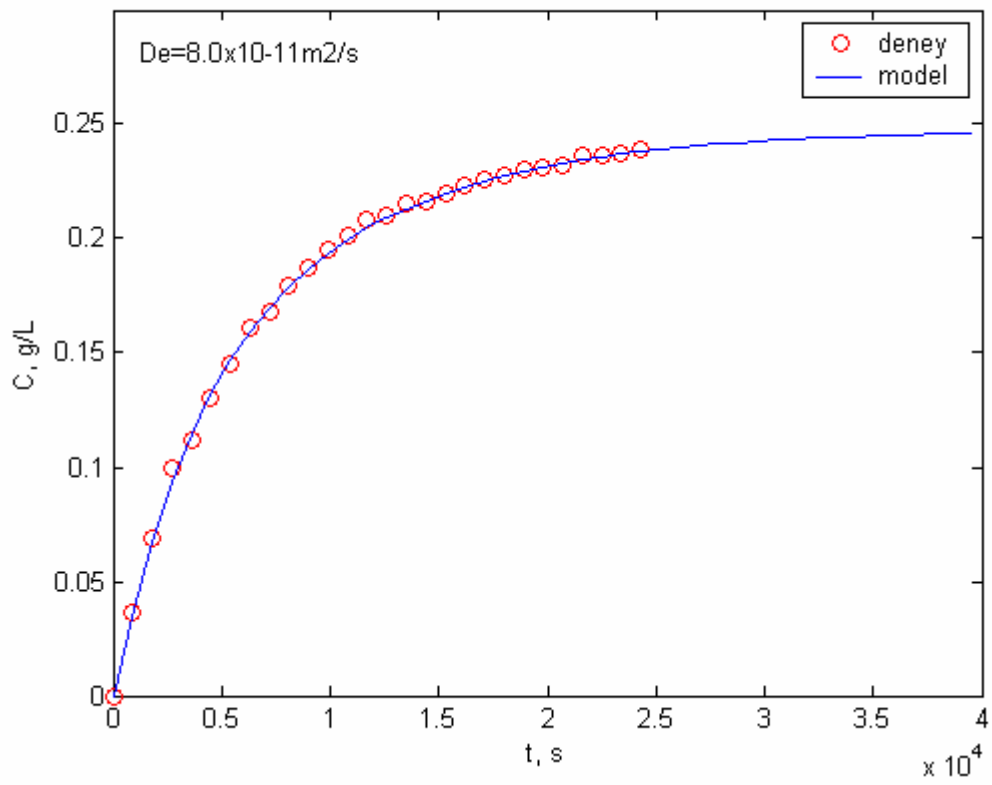
EK 8 (Devam)

- SAP, pH=7.14, CaCl<sub>2</sub>, Co=0.5 g/L  
De=7.4e-11 m<sup>2</sup>/s



EK 8 (Devam)

- SAP, pH=7.14,  $\text{CaCl}_2+(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4+\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $C_0=0.5 \text{ g/L}$   
 $De=8\text{e-}11 \text{ m}^2/\text{s}$



## ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Ankara’da doğdu. Eylül 1988 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nden Şubat 1993 yılında Kimya Mühendisi ünvanıyla mezun oldu. Eylül 1994-Eylül 1997 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda “Ultrafiltrasyon ile Proteaz Enzimlerinin Ürün Karışımından Ayırılması” başlıklı yüksek lisans tez çalışmasını tamamlayarak Kimya Yüksek Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. Haziran 1996-Kasım 2000 yılları arasında Cumhuriyet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümünde Proses ve Reaktör Tasarımı Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı. 2547 sayılı YÖK yasının 35. maddesi gereğince Doktora çalışmalarını yapmak üzere Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda geçici kadrosu ile Araştırma Görevlisi olarak görevlendirildi.

## Doktora Tez Projesi ile Gerçekleştirilen Yayınlar

**Salgın, S.,** Takaç, S. and Özdamar, T.H., A Parametric study on Protein-Membrane-Ionic Environment Interactions for Membrane Fouling, Separation Science and Technology (İncelmede Haziran 2004).

### TEBLİĞLER- Uluslararası

**Sema Salgın,** Serpil Takaç, Tunçer H. Özdamar, A Comparative Study on Interfacial Forces in Protein Fouling of Ultrafiltration Membranes 3<sup>rd</sup> Chemical Engineering Conference for Collaborative Research in Eastern Mediterranean (EMCC-3), Membrane Separations W-3/4, May 13-15, 2003, Thessaloniki, Greece.

### TEBLİĞLER- Ulusal

**Salgın, S.,** Takaç, S., Özdamar, H.T. İyonik Çevrenin Enzim-Ultrafiltrasyon Membran Ara Yüzey Etkileşimlerine Etkisi, VI. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK 6), İzmir (Sözlü Bildiri-Kabul edildi).

**Salgın, S.,** Takaç, S., Özdamar. Membranda Protein Kirliliğinin Kantitatif Analizi: Etkin Difüzyon Katsayısının Bulunması, VI. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK 6), İzmir, (Sözlü Bildiri-Kabul edildi).

**Salgın, S.,** Takaç, S., Özdamar. Ultrafiltrasyon Membranlarda Protein Kirliliği Üzerine İyonik Çevre Etkisi, XIII. Biyoteknoloji Kongresi, Ağustos 2003, Çanakkale, Türkiye

**Elmas, S.,** Takaç, S., Çalık, P., Özdamar, H., T., Serin Alkali Proteaz Enziminin Biyoreaktör Ürün Karışımından Çapraz Akım Ultrafiltrasyon ile Ayrılmasında İşletim Parametrelerinin Etkisi, IV. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi Bildiri Özet Kitabı, İstanbul Üniversitesi, 4-7 Eylül 2000, TA19

Şenver, İ., **Elmas, S.,** Çalık, P., Takaç, S., Çalık, G., Özdamar, H., T., Serin Alkali Proteaz Enziminin Kararlılığı ve Kararlılığının Artırılması, IV. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi Bildiri Özet Kitabı, İstanbul Üniversitesi, 4-7 Eylül 2000, BT01.