

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HALOFİLİK AKUAPORİN İLE MODİFİYE EDİLMİŞ
MEMBRANIN TUZ VE ÇÖZÜNÜR ORGANİK MADDELERİ
İTME PERFORMANSLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

AYŞEN YILDIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HALOFİLİK AKUAPORİN İLE MODİFİYE EDİLMİŞ
MEMBRANIN TUZ VE ÇÖZÜNÜR ORGANİK MADDELERİ
İTME PERFORMANSLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

AYŞEN YILDIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MELEK ÖZKAN

GEBZE
2019

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**EVALUATION OF THE REJECTION PERFORMANCE
OF SALT AND ORGANIC SOLUTES OF
HALOPHYLIC AQUAPORIN MODIFIED MEMBRANE**

AYŞEN YILDIZ
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MELEK ÖZKAN

GEBZE
2019

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/06/2019 tarih ve 2019 /27 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 18/07/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan AYŞEN YILDIZ'ın tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) :PROF. DR. MELEK ÖZKAN

ÜYE

:PROF. DR. AYTEN YAZGAN KARATAŞ

ÜYE

:DOÇ. DR. PINAR ERGENEKON

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Akuaporinler, canlı hücre zarlarında su geçişini kontrol eden protein kanallarıdır. Bu yapılar canlılığın devamı için gerekli olan suyu hücre içerisine alırken diğer molekülleri itme özelliğine sahiptir. Akuaporinlerin bu seçici mekanizmaları biyomimetik desalinasyon membran tasarımlarında kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında halofilik bir bakteri olan *Halomonas elongata*'dan *E. coli*'ye klonlanmış olan halofilik akuaporin kullanılmıştır. *H. elongata* akuaporinlerini içeren proteolipozomlar ara yüzey polimerizasyon yöntemi ile polisülfon membran yüzeyine kaplanarak biyomimetik İnce Film Nanofiltrasyon (TFN) membranı hazırlanmıştır. Membranın farklı tuz konsantrasyonlarında ve farklı basınçlardaki su geçirgenliği ve tuz itme kapasitesi akuaporin içermeyen kontrol membranı ile kıyaslanmıştır. Ayrıca hazırlanan biyomimetik membranın glukoz, üre ve gliserol maddelerini itme kapasitesi belirlenmiştir. *H. elongata* akuaporini ile üretilmiş biyomimetik membranın tüm çözeltileri itme hızı ($\text{g/m}^2.\text{sa}$) ve akısı ($\text{L/m}^2.\text{sa}$) kontrol membrandan daha yüksek bulunmuştur. Akuaporin içeren membranın tuz itme hızı $247.36 \text{ g/m}^2.\text{sa}$, glikoz itme hızı $86.81 \text{ g/m}^2.\text{sa}$, üre itme hızı $36.6 \text{ g/m}^2.\text{sa}$, gliserol itme hızı ise $34.43 \text{ g/m}^2.\text{sa}$ olarak ölçülmüştür. Aquaporin bazlı biyomimetik nanofiltrasyon membranlarının geliştirilmesinde *H. elongata* akuaporininin, *E. coli* akuaporini yerine kullanılabilecek güçlü bir alternatif olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Akuaporin, Biyomimetik membranlar, Desalinasyon, Halofilik bakteri.

SUMMARY

Aquaporines are membrane proteins that control the water passage in the living cells. These proteins have the ability to reject molecules while taking the water which is necessary for the continuation of life. These selective mechanisms of aquaporins have attracted considerable interest in biomimetic membrane designs. In this study, a biomimetic nanofiltration membrane was prepared by using a halophilic aquaporin from *Halomonas elongata*, which was cloned in *E. coli* BL21 previously. Aquaporines was purified from recombinant *E. coli* cells and they are embedded in liposomes produced with DOPC oil. Proteoliposomes containing *H. elongata* aquaporins were coated on the surface of the polysulfone membrane by the interfacial polymerization method and a new biomimetic membrane was developed. The water flux and salt rejection rate of membrane with *H. elongata* aquaporin were higher than the control membrane. Then, glucose, urea and glycerol rejection capacities of the membrane were also investigated. The rejection rate of biomimetic membrane produced by *H. elongata* aquaporin was higher than the control membrane for all solutes. The salt, glucose, urea and glycerol rejection rates of the aquaporin based biomimetic membrane were found to be 247.36 g/m².sa, 86.81 g/m².sa, 36.6 g/m².sa, 34.43 g/m².sa, respectively. Thus, for the development of aquaporin-based biomimetic nanofiltration membranes, *H. elongata* aquaporin is a good alternative to *E. coli* aquaporin.

Key Words: Aquaporin, Biomimetic membranes, Dessalination, Halophilic bacteria.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgisi ve tecrübesiyle her zaman yol gösteren, danışmanım Sayın Prof. Dr. Melek ÖZKAN'a,

Tez çalışmamın ortaya çıkmasını sağlayan 115Z245 No'lu projeye destek veren ve bana Proje Asistanı olarak çalışma imkânı sağlayan TÜBİTAK'a,

Desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anneme, babama ve eşime,

Çalışmalarım boyunca hiçbir bilgisini sakınmadan paylaşan ve yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Hilal YILMAZ'a, Gazel Öyküm ÖZDEMİR'e, Gazale Nur ÇALICIOĞLU BİROL'a, Ayşenur ÖZTÜRK'e ve Esra MEŞE'ye teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. LİTERATÜR	3
2.1. Biyomimetik Yaklaşım	3
2.2. Membran Teknolojileri	4
2.3. Desalinasyon	7
2.4. Akuaporinler	9
2.4.1. Akuaporin Yapısı ve Çalışma Mekanizması	11
2.5. Akuaporin Bazlı Biyomimetik Membranlar (ABM)	14
2.6. Halofilik bakteriler ve <i>Halomonas elongata</i>	16
3. MATERYAL ve METOT	18
3.1. Akuaporinlerin Hücre Zarından Saflaştırılması	18
3.2. SDS-PAGE Jel Analizi	19
3.3. Lipozom Hazırlama	20
3.3.1. Protein İçermeyen Lipozom Hazırlama	20
3.3.2. Akuaporinli Lipozom Hazırlama	20
3.3.3. Lipozomların Su Geçirgenliklerinin Tayini	21
3.4. Proteolipozom İçeren Membran Yapımı	22
3.5. Basıncılı Ortamda Ölü Uçlu Filtrasyon Hücresi ile (Dead End)	23
Ölçümler	
3.6. Çözelti Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	24

3.6.1. Çözeltilerin Tuz Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	24
3.6.2. Çözeltilerin Glikoz ve Gliserol Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	24
3.6.3. Çözeltilerin Üre Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
4.1. <i>H. elongata</i> Akuaporininin Saflaştırılması	26
4.2. Akuaporinlerin Su Geçirgenliklerinin Belirlenmesi	27
4.3. HeAQP İçeren Membranların Tuz İtme ve Su Geçirgenlik Ölçümleri	30
5. SONUÇLAR	
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
Å	: Angstrom
cm	: Santimetre
cm ³	: Santimetreküp
g	: Gram
J _{SR}	: İtme hızı
J _V	: Akı
L	: Litre
m ²	: Metrekare
µs	: Mikrosiemens
mg	: Miligram
P _f	: Ozmotik geçirgenlik
R	: 87.4 nm (200 nm çapındaki protein içermeyen lipozom için Nano Zetasizer ölçüm sonucu)
S	: Lipozomların başlangıç yüzey alanı
V ₀	: Lipozomların başlangıç hacmi
V _w	: Suyun kısmi molar hacmi (18 cm ³ /mol)
Δ _{osm}	: Lipozom içerisindeki sıvı ile lipozom dışarısında bulunan sıvı arasındaki osmolarite farkı
ABM	: Akuaporin bazlı biyomimetik membran
AQP	: Akuaporin
Arg-195	: Arjinin 195
BL	: Protein içermeyen lipozom
DOPC	: 1,2-diöleoil-sn-gliserol-3-fosfolin
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i> BL21	: <i>Escherichia coli</i> BL21 suşu
Glpf	: Gliserol alım kolaylaştırıcı (Glycerol uptake facilitator)
GST	: Glutasyon S-transferaz
H ₃ O ⁺	: Hidronyum iyonu
Heaqp	: <i>Halomonas elongata</i> akuaporini

His-180	: Histidin 180
HL	: <i>H. Elongata</i> akuaporini içeren lipozom
IPTG	: İzopropil-beta-d-thiogalaktosid (Isopropyl-beta-D-thiogalactoside)
LB	: Luria sıvı besiyeri (Luria broth)
MF	: Mikrofiltrasyon
MPD	: M-phenylene-diamine
NF	: Nanofiltrasyon
NO ₂ ⁻	: Nitrit
NO ₃ ⁻	: Nitrat
NPA	: Asparagin-prolin-alanin
OG	: Oktil β-D-glukopiranosid
Osm	: Ozmotik katsayı
PDI	: Polidispersite indisi
PS	: Polisülfon
RO	: Ters ozmoz
Sa	: Saat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (Sodium Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TMC	: Trimesoyl chloride
UF	: Ultrafiltrasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil no:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Bir Aqp1'in alt birimi içerisindeki kanal yapısının şematik gösterimi (sagittal kesit).	13
2.2: Akuaporin monomerinin genel yapısı.	14
2.3: Arayüzey polimerizasyon yöntemi.	16
2.4: Arayüzey polimerizasyon yöntemi ile oluşturulmuş itme tabakasında lipozomların konumu ve su geçişi.	16
3.1: Akış durduran ışık saçılım spektrometre prosesi.	22
3.2: Proteolipozom içeren membran yapısı.	23
4.1: SDS-Page jel üzerinde Marker ve GST-HeAqp monomerlerinin oluşturduğu bantlar.	26
4.2: Protein içermeyen lipozomların (akuaporin içermeyen kontrol) (1) ve HeAQP içeren proteolipozomların (2) 0.85 M NaCl çözeltisindeki zamana bağlı normalize ışık saçılımı grafikleri.	28
4.3: Akuaporin/lipit (mg/mL) oranının k (s^{-1}) değerine etkisi.	30
4.4: Akuaporin (2 mg/mL) içeren membranların 5 bar ve 10 bar basınç uygulamasında su geçirgenlikleri ve tuz itme hızları.	34
4.5: 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL lipozom/proteolipozom içeren kontrol ve akuaporinli membranların glikoz itme hızları ve kararlı akıları.	36
4.6: 1 mg/mL proteolipozom konsantrasyonlarında hazırlanan kontrol ve akuaporinli membranların glikoz, üre ve gliserol itme hızları ve kararlı akıları.	37

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Deniz suyunun içeriği.	8
4.1: DOPC yağı ile hazırlanmış, 200 nm boyutunda, akuaporin içeren ve içermeyen lipozomların su geçirgenliği katsayısı (k) değerleri.	28
4.2: Lipozomların ve proteolipozomların su geçirgenlikleri (Pf).	29
4.3: Akuaporin/lipit (mg/mL) oranının k (s-1) değerine etkisi.	29
4.4: 5 bar basınç altında, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL lipozom konsantrasyonlarında, protein içermeyen lipozom ve akuaporin içeren lipozom ile kaplı membranların filtrasyon parametreleri (BL: protein içermeyen lipozom ile kaplı membran, HL: <i>H. elongata</i> akuaporini içeren lipozom ile kaplı membran).	32
4.5: 10 bar basınç altında, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL lipozom konsantrasyonlarında, protein içermeyen lipozom ve <i>H. elongata</i> proteini içeren membranların filtrasyon parametreleri.	33
4.6: 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL proteolipozom konsantrasyonlarında, kontrol ve akuaporinli membranların glikoz filtrasyon parametreleri.	35
4.7: 1 mg/mL lipozom/proteolipozom içeren kontrol ve akuaporinli membranların üre filtrasyon parametreleri.	36
4.8: 1 mg/mL lipozom/proteolipozom içeren kontrol ve akuaporinli membranların gliserol filtrasyon parametreleri.	37

1. GİRİŞ

Su, hayatın sürdürülebilmesi için gerekli olan en önemli doğal kaynaktır. 21. Yüzyılının temel sorunlarından belki de en önemlisi su kıtlığı ve iklim değişikliği olarak kabul edilmektedir [1]. Dünya'daki suyun yaklaşık % 97.5'i tuzlu su ve % 2.5'i tatlı su olarak bulunmaktadır. Toplam tatlı su kaynaklarının sadece % 31.1'i insan tüketimi için uygun olan akiferlerde, göllerde ve nehirlerde birikmiştir. Son yıllarda, tarımsal, endüstriyel ve evsel amaçlı kullanılan su miktarındaki artış nedeni ile tatlı su ihtiyacı önemli ölçüde artmıştır. Tatlı su kıtlığı, çok büyük sosyoekonomik ve çevresel etkileri olan bir problemdir. Su kıtlığı probleminin global bir resmini ortaya koymak için, su kıtlığı görülen bölgelerin tespitine dayalı zamansal ve mekânsal çalışmalar yapılmıştır [2]. Ancak kent yaşamının fazla olduğu toplumlarda giderek artan su ihtiyacını karşılamak için su kaynaklarının iyileştirilmesi gerekmektedir [3].

Tatlı su talebi arttıkça tuzlu su ve deniz suyu arıtımında desalinasyona verilen önem de artmaya başlamıştır. Özellikle yarı kurak bölgelerde tatlı su elde etmek için desalinasyon yöntemlerinin önemi gitgide artmaktadır [4], [5]. Membran prosesleri, sularda bulunan çeşitli kirleticileri ve çözünmüş katı maddeleri ayrıştırmak için yaygın olarak kullanılırlar [6]. Membran proseslerinin yaygın kullanım sebeplerinden bazıları; kullanım kolaylığı, yüksek kararlılık, verimlilik ve düşük enerji ihtiyacıdır. Membran proseslerinin uygulanma alanları oldukça geniştir ve bu alandaki çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle membran teknolojileri alanında temel bilgilere sahip mühendis, bilim insanı, teknisyen ihtiyacı da artmaktadır [3].

Son yıllarda, ayrıştırma prosesleri için membran geliştirme çalışmalarında biyomimetik yaklaşım önemli bir yer edinmeye başlamıştır. Biyomimetik membranlar biyolojik yapıları içerirler ve biyolojik sistemlerden ilham alınarak geliştirilirler. Bu tür membranlar, doğanın milyarlarca yıl geliştirmiş olduğu verimlilik ve özgünlük stratejilerini avantaja dönüştürebilirler.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, halofilik bir bakteri olan *H. elongata*'dan *E. coli*'ye klonlanan akuaporinler saflaştırıldıktan sonra, lipozomlara yerleştirilmiş ve bu lipozomlar atık su arıtımında kullanılan polisülfon (PS) membran yüzeyine kaplanmıştır. Elde edilen TFN membranın çeşitli çözünür maddeleri arıtabilme performansı araştırılmıştır. Tez alışması kapsamında halofilik akuaporin içeren membranın farklı tuz konsantrasyonlarındaki tuz itme kapasitesi tespit edilmiş, uygun akuaporin ve lipozom konsantrasyonu ve filtrasyon basıncı belirlenmiştir. Ayrıca membranın glukoz, gliserol ve üre gibi çözünür maddeleri tutma kapasitesi de araştırılmıştır.

Tez kapsamında *H. elongata* aquaporininin biyomimetik filtrasyon membranlarının üretiminde kullanım potansiyeli ortaya konmuştur.

2. LİTERATÜR

2.1. Biyomimetik Yaklaşım

Biyolojik sistemlerin karmaşık yapısı ve bu karmaşık yapıya rağmen canlı organizmaların hayati fonksiyonları minimum enerji ve maksimum verimle yerine getirmesi insanoğlunu her zaman etkilemiştir [7]. Biyomimikri, çevre tarafından test edilen ve evrim yoluyla geliştirilen biyolojik formlardan, süreçlerden ve ekosistemlerden öğrenmeyi ve taklit etmeyi içerir. Biyomimikri, herhangi bir ölçekte teknik ve sosyal sorunları çözmek için uygulanabilir. Biyomimikriğin popülerleşmesi, yalnızca ekonomik beklentileri nedeniyle değil, aynı zamanda insanlık tarihinin bu kritik noktasında çevre dostu tasarımlara ilham verme potansiyeli nedeniyle de heyecan vericidir. Biyomimik malzeme üretmenin amacı, doğal bir formun, işlemin veya ekosistemin tam bir kopyasını oluşturmak değildir; bunun yerine, tasarım ilkelerini biyolojiden türetmek ve bu ilkeleri fikir edinmek için kullanmaktır [8].

Amerikalı mucit Otto Schmitt, 1960'larda fikirlerin biyolojiden teknolojiye aktarılmasını tanımlamak için “biyomimetrik” terimini kullanmıştır [8]. Her biri kendine özgü avantaj ve dezavantajlara sahip olan biyomimetik tasarımlara farklı yaklaşımlar mevcuttur [9]. Biyomimetik tasarımlar, tüm tasarımlar gibi, potansiyel olarak tehlikeli ve yaratıcı olanlar da dahil olmak üzere çeşitli şekillerde karşımıza çıkabilir. BigDog gibi biyomimetik robotik teknolojiler hem yaratıcı hem de zararlı şekillerde kullanılabilir. Ekosistem düzeyinde biyomimikriğin bir başka amacı ise, biyomimetik tasarımların sosyal açıdan yararlı yollarla kullanılmasını sağlamaya çalışmaktır [8].

Biyomimikri son zamanlarda ayırıştırma işlemleri için geliştirilen membran tasarımında da başvurulan bir yaklaşımdır. Biyomimetik membranlar, biyolojik yapıları içerirler ya da biyolojik sistemlerden fikir ve ilham alırlar. Bu tür membranlarda, doğanın milyarlarca yıl boyunca geliştirmiş olduğu stratejilerin avantajları, geçirgenlik verimliliğinin ve seçiciliğinin artırılması için kullanılır. Membran proseslerini geliştirmek amacıyla yapılan biyomimetik membran çalışmaları umut vaatmektedir [3].

2.2. Membran Teknolojileri

Su, bütün ayırma proseslerinde temel bileşendir ve uygulamaya bağlı olarak gereken suyun saflık derecesi de değişebilir. Membran prosesleri biyoteknoloji alanında oldukça geniş bir kullanıma sahiptir [10]. Membranla ayırma prosesleri, su, enerji, ilaç ve daha birçok endüstriyel uygulamalarda önemli bir rol oynamaktadır. Desalinasyon yöntemlerinden biri olarak da kullanılan membran teknolojileri, değişik endüstriyel sektörlerde kullanılan önemli bir seperasyon yöntemidir. Ayrıca membranlar kaliteli ve düşük maliyetli su elde etmek için geleneksel yöntemlere alternatif oluşturmaktadırlar [11], [12]. Membran teknolojileri, su kıtlığı problemine çözüm üretebilecek bir yöntem olmakla beraber verimlilik ve enerji minimizasyonu açısından iyileştirilmelidirler [13].

Membranlar sıvılarda faz değişimi olmadan hem ayırma hem de bileşenlerin konsantrasyonunu gerçekleştirmek için benzersiz bir fırsat sunarlar [14]. Ayrıca, dünya genelinde verimli kentsel ve endüstriyel atıksu arıtımı için en güçlü teknolojilerden biri olarak kabul edilmektedirler [15]. Atık su arıtımı için, membran biyoreaktörler bazı avantajlar sağlarlar. Bu avantajlar; çıkan atıksuyunun yeterli derecede iyi arıtılmış olması, hacimsel organik yüklemenin daha fazla olması, daha az çamur üretimi ve ayakizinin daha küçük olmasıdır [16], [17]. Membranlar ayrıca atık sudan N ve P geri kazanımı gibi çeşitli sıvılardan nutrientlerin geri kazanımı için de kullanılabilirler [18].

Membran prosesleri çoğunlukla atık su arıtımı ve desalinasyon amaçları için tercih edilmesine rağmen, çeşitli endüstrilerde farklı amaçlar için kullanılmıştır. Biyodizel yakıtın kalitesini yükseltmede ve saflığını sağlamadaki yeteneği nedeniyle, membran teknolojisi büyük ilgi görmüştür [19]. Bu teknoloji, biyodizel kalitesini artırmak için serbest asit metil esterlerden gliserolün ayrılmasında kullanılır [20]. Membran prosesleri orta sıcaklık ve basınçlarda çalıştığından, diğer geri kazanım proseslerine göre avantajları fazladır ve hafif bir immobilizasyon veya ayırma metodu sunmaktadırlar [10], [21], [22]. Süt endüstrisindeki uygulamalar, amino asitlerin veya proteinlerin geri kazanılmasını [23], [24], proteinlerin parçalanmasını, buharlaşma öncesi ürünlerin konsantrasyonunu, suyun geri kazanılmasını ve gıda endüstrisi atıklarından besleyici olarak önemli maddelerin güvenli bir şekilde işlenmesini içerir [25]. Şeker işleme prosesi, gıda ve kimya endüstrisindeki enerji

yoğunluğu en yüksek işlemlerden biridir. Bu nedenle, membranla ayırma işlemleri farklı uygulamalardan oluşabilir. Bununla birlikte, şeker işleme proseslerinde yüksek hacimli pompanın gerekliliği, membran işlemlerinin kullanımı için bir sınırlama oluşturmaktadır.

Membran prosesleri, yüksek stabilite, verimlilik, düşük enerji gereksinimi ve kullanım kolaylığı nedeniyle su arıtmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [13]. Elde edilmek istenen su kalitesine göre tercih edilmesi gereken membran prosesi de değişiklik gösterir. Membranlar kullanım amacına ve gözenek boyutuna göre mikrofiltrasyon (MF), ultrafiltrasyon (UF), nanofiltrasyon (NF) ve ileri filtrasyon (Ters ozmos filtrasyonu) olarak sınıflandırılabilirler. Yapısal olarak ise seramik veya polimer yapıda olabilirler.

Mikrofiltrasyon membranları, gözenek boyutları 0,1 ile 1,4 μm aralığında olan ve mikron ile mikrondan daha küçük parçacıkları ayırmak için kullanılan membranlardır. Çapı 0.05 ile 2 μm aralığındaki makro moleküllerin ve askıda katıların ayrılmasını sağlarlar. Nişasta, bakteri, yağ, maya, alg ve benzeri maddeler MF ile giderilebilir. Seçici geçirgenlik için ihtiyaç duyulacak basıncın düşük olması (0.2-0.5 bar) harcanacak enerji miktarını da düşürür. Atık su arıtımı için verimli bir filtre görevi gören MF membranları gıda atık suyu ve kirli yüzeysel suların arıtılmasında çok verimli olmayabilir. Bunun yerine UF membranı tercih edilebilir. İçme ve kullanma suyu amacıyla MF kullanılması durumunda çıkış sularının mutlaka dezenfekte edilmesi gerekir. Çünkü virüs gibi küçük boyutlu bileşenler rahatlıkla geçebilmektedir.

Ultrafiltrasyon membranları, geçirilen sıvının saflaştırılması veya membran tarafından tutulan maddelerin konsantre hale getirilmesi amacı ile kullanılmaktadırlar. Membran porlarının boyutları 0.05-1 nanometre arasında değişir. UF membranlarında üst tabakayı destekleyen bir alt tabaka bulunur. Filtrasyon üst tabakada meydana gelmektedir. Bakterilerin ve virüslerin giderimi içinde kullanılan UF membranında basınç artışı akıyı da artırır.

Nanofiltrasyon membranları, 0.001-0.005 μm çaplı divalent iyonların geçişini engellerken, monovalentlerin geçişine izin vermektedir. Arıtılmak istenen suda renk, koku, tat oluşumuna neden olan bileşiklerin giderilmesinde verimlidir. NF membranları ile kirleticiler yüksek oranda giderilir. Desalinasyon için uygundur çünkü tuzları da tutabilir. Uygulanması gereken basınç ise ters ozmos prosesine göre daha düşüktür. Membran gözenekleri nano boyutta olduğu için basınç ile

çözeltilerden iyonların ayrılmasında kullanılabilir. Proses RO'ya benzer ancak enerji tüketimi daha düşüktür. Nanofiltrasyon için umut vaat edici perspektifler olmasına rağmen, içme suyu üretiminde, atık su arıtımında, gıda, kimya ve ilaç endüstrilerinde hala büyük ölçekli uygulamaları yavaşlatan çözilememiş problemler mevcuttur. Bu problemler 6 başlıkta sıralanabilir: 1-Membran kirlenmesini önlemek ve iyileştirme olanakları, 2-elde edilen çözeltilerin ayrılmasını sağlamak, 3-konsantre maddelerin daha fazla arıtılması, 4-membranların kimyasallara direnci ve limitli kullanım ömrü, 5-su arıtımında kirleticilerin yeteri kadar itilememesi, 6-modelleme ve simülasyon araçlarına duyulan ihtiyaç. Nanofiltrasyon araştırmalarında bu başlıklara öncelik verilmesi tavsiye edilmektedir [11]. Nanofiltrasyon membranları saflaştırmadan çok ayrıştırma işlemleri gibi zorlu uygulamalarda kullanılabilir. Monovalent tuzları multivalent tuzlardan daha az ittiği öğrenildiğinden bu yana nanofiltrasyon membranlarının tuz ayrıştırma için kullanılabildiği iyi bilinmektedir [26].

İleri ozmos prosesi, doğal osmotik basınç farkından yararlanılarak seyreltik çözeltilerden derişik çözeltilere suyun akmasına dayanır. İleri ozmos için herhangi bir hidrolik basınç gerekmez ve tuzluluğu yüksek, kirli sular bu şekilde arıtılır [27]. İleri ozmos teknolojileri ile suyun yeniden kullanımı [28], [29], çıkarılan suyun arıtımı [6], [30], tuzlu su arıtımı [31], [32] ve sıfır sıvı deşarjı sağlanabilmiştir [33], [34].

Hollow fiber membranlar, ileri ozmoz prosesinde kullanıldığında, yüksek sızdırmazlık oranı ve kendinden destekli yapıları nedeniyle ultrafiltrasyon, diyaliz ve gaz ayrımı için büyük umut vadetmektedirler [35]. Akuaporin içeren ileri ozmos hollow fiber membran performansının diğer hollow fiber membranlara göre akı ve tuz itme bakımından daha iyi olduğunu belirten ve diğer biyomimetik membranlar ile karşılaştırılmasını tavsiye eden bir çalışma mevcuttur [36].

Çok düşük moleköl ağırlığına sahip maddelerin giderimi için ters ozmoz (RO) prosesi kullanılmaktadır. Normal bir ozmos (diyaliz) prosesinde, su, saf su tarafından, konsantre çözelti tarafına akma eğilimindedir veya suyun çok bulunduğu ortamdan, az bulunduğu ortama doğru geçer. Bu geçiş süreci osmotik denge sağlanana kadar devam eder.

Ters ozmos prosesinde ise su, basınç yardımı ile, kirletici veya çözünmüş madde konsantrasyonu yüksek olan taraftan membranın karşı tarafına geçirilir. Diğer bir deyişle su, basınç yardımı ile yoğun ortamdan ayrılıp daha az yoğun bir ortama geçirilmiş olur. Basınç yoğun çözelti tarafından uygulanır. Sonuç olarak kirleticiler

ya da bileşenler membran tarafından tutulur ve çözelti temizlenmiş olur. Bu olaya ters ozmos veya hiperfiltrasyon denir.

Bununla birlikte ters osmoz membranları fazla enerji tüketimi gerektirir. İleri osmoz membranları ise geniş membran yüzey alanı gerektirir. Bunlar ticari olarak kullanılan ters osmoz ve ileri osmoz membranlarının düşük verimlilik nedenleridir [34].

Gözenekleri 0.1 nm ile 1.5 nm çap aralığında olan membranlar ters ozmos için kullanılır. Nano boyutundaki bu gözeneklerden düşük molekül ağırlığındaki bileşenler geçemez ancak bazı solvent ve virüsler geçebilir. 30-100 bar arasında basınç uygulanabilir, 10 bara kadar düşük basınç ile yapılan yeni çalışmalarda verimli sonuçlar elde edilmektedir.

Uygulanan yüksek basınç sayesinde membran yüzeyi ile süzüntü akısı arasında moleküler sürtünme artmaktadır ve böylece nano boyutlu gözeneklerden sadece su ve gözenekten daha küçük boyutlu bileşenler geçebilir. Diğer bileşenler membran tarafından tutulur. RO membranları bütün çözünmüş organik ve inorganik bileşenleri tutabilir. RO için uygulan basınç, yeni teknolojik gelişmeler sayesinde 10 barlara kadar düşürülebilmektedir. Ters ozmos sistemleri, su kalitesini iyileştirmek, atık suları arıtmak, deniz suyundan içme veya tatlı su elde etmek, suların sertliğini gidermek amaçları ile uygulanmaktadır.

Diğer taraftan biyolojik membranlar, hücrelerin sınırlarını tanımlar ve seçici geçirgenlik sağlayarak hücrenin çevresi ile etkileşimini kontrol ederler. Biyolojik membranların etkin özellikleri, sentetik membranlarla ilgili çalışmaların bu yönde ilerlemesini sağlamıştır. Bowen, 2006 yılındaki makalesinde seçicilik ve geçirgenlik bakımından biyolojik membranları taklit edecek olan bir biyomimetik membranın geliştirilmesini tavsiye etmiştir [37]. Kısa bir süre sonra Kumar ve arkadaşları [5] akuaporin denilen yapıların sentetik membranlara katılmasıyla oluşturulan biyomimetik membranlar hakkında bir makale yayınlamışlardır.

2.3. Desalinasyon

Yeryüzünün neredeyse % 70'ini deniz ve okyanuslar kaplamaktadırlar. Dünyadaki su kaynaklarının ise yaklaşık olarak % 97'sini oluşturmaktadır. Deniz suyu Dünya'da bol olmasına rağmen kullanım ya da içme suyu olarak

kullanılmamaktadır. Bunun nedeni deniz suyu içeriğinin içme ve kullanım suyunun olması gereken standartlarından farklı olmasıdır.

Tablo 2.1: Deniz suyunun içeriği.

Deniz suyunun içeriği	Konsantrasyon (%)
Kalsiyum	0.042
Magnezyum	0.13
Sodyum	1.07
Potasyum	0.04
Bikarbonat	0.015
Sülfat	0.27
Klorür	1.94
Bromür	0.007
Toplam	3.5

Deniz suyundaki tuz içeriğinin ters ozmoz için önemi vardır. Tuz ters ozmoz işlemi sırasında membranda birikerek tıkanmasına sebep olur [38].

Artan tatlı su kıtlığı ile birlikte deniz suyu gibi tuzlu suların tuzsuzlaştırılması işlemine verilen önem artmıştır. Çeşitli tuz giderme teknolojileri arasında ters osmoz (RO), diğer teknolojilere kıyasla önemli ölçüde daha düşük enerji tüketimine sahiptir. Bununla birlikte, deniz suyu arıtımı için tasarlanmış son teknoloji RO membranları, nispeten düşük su geçirgenliğine sahiptir ve bu problem membran bazlı desalinasyonda RO membranlarının performanslarını sınırlamaktadır. Bu nedenle, yüksek performanslı RO membranlarının geliştirilmesi, desalinasyon alanındaki öncelikli araştırma konularından biri haline gelmiştir [4].

Desalinasyon proseslerinde kullanılan geleneksel membranlar, geçirgenlik ve seçicilik arasında bir “denge” etkisi olan yoğun polimerik filmlerdir [13]. Genel olarak desalinasyon işlemleri, faz değişimi (termal işlem) ve membran prosesleri olmak üzere iki ana tipte sınıflandırılabilir. Faz değişim işlemlerinden bazıları, çok aşamalı şok damıtma, çok işlemli damıtma, buhar sıkıştırma, dondurma, nemlendirme-kurutma ve güneş enerjili damıtmadır. Membran bazlı işlemler ters ozmoz, membranla damıtma ve elektrodializdir. Ters ozmoz işleminde gerekli

basınç, tuzlu su çözeltisinin kaynağının tuz konsantrasyonuna bağlıdır; deniz suyunun tuzdan arıtılması için normalde 70 bar civarındadır [39]. Ancak son çalışmalar ile birlikte ters ozmoz işlemlerinde uygulanan basınç 10 bara kadar düşürülmüş ve verimli sonuçlar alınmıştır [37].

2.4. Akuaporinler

Akuaporinler hücre zarlarında bulunan ve su moleküllerinin geçişine izin veren ancak iyonların geçişini engelleyen proteinlerdir [1]. Son bulgular, aquaporinin rolünün su hareketi ile sınırlı ya da bağlantılı olmadığını göstermektedir. Bazı izoformların yanısıra üre gibi noniyonik, küçük nötr çözünenlerin transportunda ve nitrat, klorür ve amonyak gibi iyonların geçişinde de rol oynarlar [40]. Bu proteinlerin daha birçok özelliği ortaya çıkarılmayı beklemektedir. Yeni bulgular, endüstriyel kullanımlar için tercih edilen daha verimli biyomimetik membranların geliştirilmesinin önünü açacaktır [41].

Fonksiyonlarına göre genel olarak iki ana grupta sınıflandırılabilirler. Birinci grup çok iyi su geçirgenliğine sahip olan klasik akuaporinlerdir. İkinci grup ise hem su hem de gliserol geçirgenliği olan akuagliseroporinlerdir. Akuagliseroporinlerin gözenek çapı, klasik akuaporinlerinkinden biraz daha büyüktür ve gözenek, bir klasik akuaporin gözeneği ile karşılaştırıldığında nispeten hidrofobik yapılar ile astarlanmıştır. Birçok bakteri her türden birine sahiptir. Örnek olarak *Escherichia coli* klasik AkuaporinZ ve akuagliseroporin GlpF kanallarına sahiptir [13].

Su kanal proteinleri olan akuaporinler hücre zarlarında çift yönlü bulunurlar ve hücrelerin içindeki ve dışındaki suyun akışını düzenlerler [42]. Biyolojik membranlar bu proteinler sayesinde ozmotik basınç gradyanı boyunca en etkili su transfer yolunu ortaya koyarlar [4]. Yüksek su geçirgenlikleri ve etkili seçicilikleri nedeniyle akuaporinlerle yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır. AQP'lerin keşfinden bu yana, bu proteinin membran teknolojisinde bir bileşen olarak kullanılması konusuna büyük ilgi gösterilmiştir. Membran prosesleri, yüksek stabilite, verimlilik, nispeten düşük enerji gereksinimi ve kullanım kolaylığı nedeniyle su arıtımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, performans düşüşü ve seçicilik-geçirgenlik dengesinin sağlanması gibi dezavantajları gidermek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır [1].

Aquaporinler uygun şartlarda iyonları iten su kanallarını oluştururlar [5]. Su, kanaldaki gözenekten, bitişik su molekülleri arasında hidrojen bağları olan tek bir kırılmamış molekül kolonu olarak geçer. Bu su molekülleri H_3O^+ şeklinde protonları da taşıyabilir. Bununla birlikte, su ile birlikte gelen bu protonların akışı, aquaporinlerden geçerken önlenir. Bu nedenle aquaporinler, sentetik polimerik membranlara dahil edilerek su akışını iyileştirme potansiyeline sahiptirler [42]. Kumar ve arkadaşları bir takım karakterizasyon deneyleri ile aquaporinlerin su geçirgenliklerini belirlemiş ve desalinasyon membranı geliştirmek için kullanılabileceğini belirtmiştir. Çalışmalarında rekombinant *E. coli*'den elde edilen aquaporinZ proteinleri saflaştırılarak lipozomların içerisine gömülmüş ve proteolipozomlar oluşturulmuştur. Oluşturulan proteolipozomların su geçirgenliklerinin 90 kat arttığı gözlemlenmiştir [5].

Suni membranların canlı membranları taklit edebilmesi amacı ile aquaporinler, bir ince film amfifilik tabaka oluşturularak ya da proteolipozomlar ile membran yüzeyine kaplanabilmektedir [4], [43]. Böylece suni membranların yüzeyleri aquaporinler ile modifiye edilerek yüksek performanslı biyomimetik membranlar geliştirilmektedir. Aquaporin bazlı biyomimetik membranlar yüksek su akışı ve çözünür maddeleri itme özellikleri nedeniyle desalinasyon için ümit vadeden bir teknoloji olarak görülmektedir.

Aquaporin ile modifiye edilmiş membran çalışmalarında üretiminin kolay olması nedeniyle genellikle *E. coli*'nin aquaporinZ proteini kullanılmaktadır. Literatürdeki bu çalışmalarda aquaporinZ proteininin membran verimliliğini arttırdığı gözlemlenmiştir [5]. Alternatif olarak, ince film kompozit AQP bazlı biyomimetik (ABM) membranlar, arayüzey polimerizasyonu yöntemi ile yapılabilir. Arayüzey polimerizasyonunda belli miktarda proteolipozom içeren m-phenylene-diamine (MPD) çözeltisinin, ince ve yoğun bir seçici geçirgen tabaka oluşturmak için tri-mesoyl chloride (TMC) ile reaksiyona girmesi sağlanır. Böylece proteolipozomlar seçici geçirgen tabakaya gömülmüş olurlar. Böylece, seçici geçirgen tabakanın çözünür madde geçirgenliği olumsuz yönde etkilenmezken su geçirgenliği artabilmektedir [43].

2.4.1. Akuaporin Yapısı ve Çalışma Mekanizması

Vücut ağırlığımızın % 70'ini su oluşturmaktadır. Farklı anatomik bölgelerde düzenli sıvı dengesini sağlamak için uygun su dağıtımı gereklidir. Bu nedenle hücre zarlarının su geçirgenliğinin doğru şekilde düzenlenmesi yaşamımız için temel bir gerekliliktir. Su kanal proteinleri olan akuaporinlerin keşfi, trans membran su hareketinin moleküler mekanizmaları hakkında yeni bilgiler sağlamıştır [44]. Seçicilik, geçirgenlik oranları ve geçit mekanizmaları, kanal proteinlerini karakterize eden üç özelliktir. Akuaporinler suyun transferi için hassas bir seçicilik gösterirler ve hatta hidronyum iyonlarını (H_3O^+) iterler [45].

Aquaporinler, küçük, hidrofobik, iç membran proteinleridir. Akuaporin yapısı için 'kum saati' modeli öngörülmüştür [45]. Akuaporinlerin açıklık kısımlarında genişleyen, orta kısmında ise daralan porları vardır. Bu daralma, küçük, nötr çözünenlerin geçişine izin verirken protonlar veya diğer iyonlar gibi yüklü moleküller için yüksek bir dielektrik bariyere yol açar [42]. Aquaporinler fosfolipid hücresel membranlara bağlanır, böylece su biyolojik zarlardan serbestçe geçebilir ancak iyonlar geçemez [4]. Akuaporinler membranda homotetramerler şeklinde bulunurlar. Homotetramerlerin her bir monomeri altı tane membranı çevreleyen α -heliks bölgesi içermektedir. Bu bölgeler, sitoplazmik yönlü amino ve karboksi uçları ile belirgin bir su gözenağı içermektedir. Memelilerde 11 civarı akuaporin tespit edilmiştir [44]. Bazı memeli akuaporinleri (örneğin, AQP1, AQP2, AQP4 ve AQP5) suyun geçişi için oldukça seçici görünmektedir, diğerleri ise (aquagliseroplinler) gliserolu (örneğin, AQP3 ve AQP8) ve daha iri çözünmüş maddeleri transfer ederler (AQP9). Memeli akuaporinlerinde öngörülen monomer boyutları 26-34 kDa arasındadır [46].

Aquaporinlerin aminoasit dizilimi, iki sıra asparagin-prolin-alanin (NPA), tek sıra "AEFL" ve "HW[V/I] [F/Y] WXGP" dahil olmak üzere birçok korunmuş yapılmış motifler göstermektedir. Aminoasit ve karboksi uçları hücre içine doğru olduğundan tekrarlar birbirlerine 180° dönmüşlerdir. Membranın karşılıklı iki yüzeyinde iki tane hemipor konumlanmıştır ve bu hemiporlar orta kısımda örtüşmüştür. Bu yapıyı altılı α -heliks yapısı çevrelemiştir [45]. Memeli aquaporinleri arasındaki genel amino asit değişiklikleri % 19-% 52 arasındadır [46].

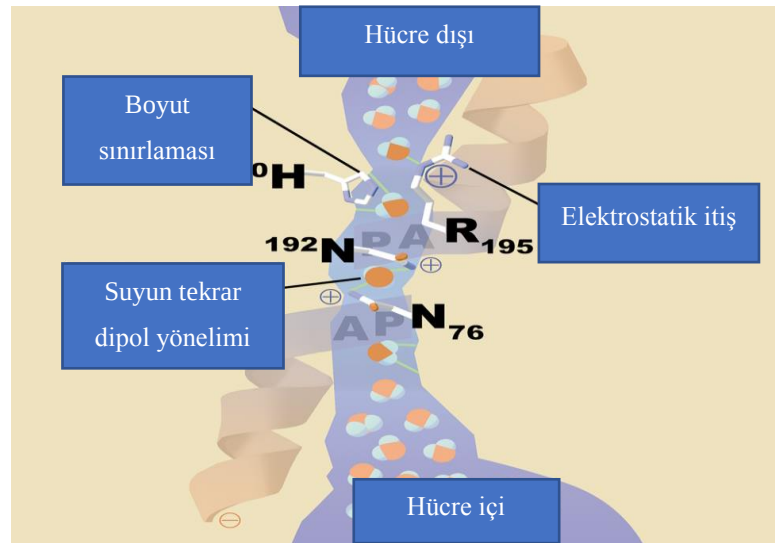
Xenopus laevis oositlerinde su kanal proteininin (AQP1) ilk keşfi ile su kanal proteinlerinin moleküler yapısı da ortaya konmaya başlamıştır [44]. Akuaporinler vasıtasıyla su transferi genellikle *Xenopus laevis* oositlerindeki CRNA akuaporininde ozmotik bir şişme deneyi ile ölçülür. Ayrıca saflaştırılmış akuaporin içeren proteolipozomların su transferi akış durduran ışık saçılımı deneyi ile ölçülebilir [46]. Eğer akuaporin su kanalı dar silindirik bir kanal ise, klasik teoriye göre kanal çapı 3.8 Å'dur [47]. Teorik işlemlerde açıkça görülsede, 3.8 Å çaplı pordan su geçebilirken daha büyük çaplı moleküllerin geçemeyeceği deneysel olarak da bulunmuştur. Aquaporinlerin oositlerden ekspresyonu ile tek kanallı su geçirgenliği kantitatif olarak analiz edilebilmiştir [46]. Aquaporin 1, su taşınımının bir gözenekte ozmoz yoluyla gerçekleştiği düşünülen bir membran protein sınıfıdır. Son zamanlarda AQP1'in karbon dioksiti de transfer edebildiği öne sürülmektedir. AQP1'in atomik yapısı suyun akuaporinden geçtiğini ama protonların geçmediğini göstermiştir. Herbiri belirgin bir dağılıma sahip 11 adet memeli akuaporini belirlenmiştir ve bu akuaporinler suya ya da su ve gliserole karşı seçici geçirgendirler [44].

Akuaporinlerden su geçişinde protonlar, sabit ve tek sıra zincir halinde, art arda hidrojen bağlı su molekülleri ile geçici olarak etkileşime girerek bir kanalı geçebilirler. AQP1 kanalının iki ana özelliği, sürekli hidrojen bağlı su molekülleri zincirinin oluşumunu önler. Proton geçişinin ilk engeli, AQP1 boyunca su yolunun en dar kısmında gerçekleşir. İki tabakanın ortasından yaklaşık 8 Å yukarıda, kanal, Arg-195, Phe-56 ve His-180 karşılıklı zincirleri ile kaplanmıştır. Buradaki Arg-195, protonlu suyu (H_3O^+) itmek için güçlü bir pozitif yük taşır. Moleküler dinamik simülasyonlar, hidrojen bağlı su zincirlerinin Arg-195'e yakın kesildiğini ortaya çıkarmıştır. His-180, su geçirgenliğine sahip her memeli akuaporininde bulunur ve gözenek çapını nötral pH'da bir kısmi pozitif yük ile sınırlar. Buna karşılık, bu pozisyonadaki çok fonksiyonlu akuaporinler daha geniş çaplara sahiptir. Akuagliseroporinlerdeki GlpF, His-180'e benzer pozisyonadaki bir glisin yapısı ile, gliserol gibi poliollerin uzunlamasına geçişine izin verecek şekilde yaklaşık 1 Å daha geniş bir gözenek çapına sahiptir. Proton geçişindeki ikinci engel ise AQP1 merkezinde birleşen hemiporlardaki NPA motifi içeren iki kısa heliks gözeneği tarafından oluşturulan güçlü dipol yapısıdır. Burada önemli olan, bu kısmi yüklerin ve Asn yapıların kanaldan geçen su moleküllerini yeniden yönlendirmesidir. Bu dipol yönlendirme su molekülleri ile üstünde ve altındakiler arasındaki hidrojen bağı

etkileşimlerini bozarak proton iletkenliği olasılığını gidermektedir. Çok az istisna dışında, iyonlar akuaporinleri geçemezler.

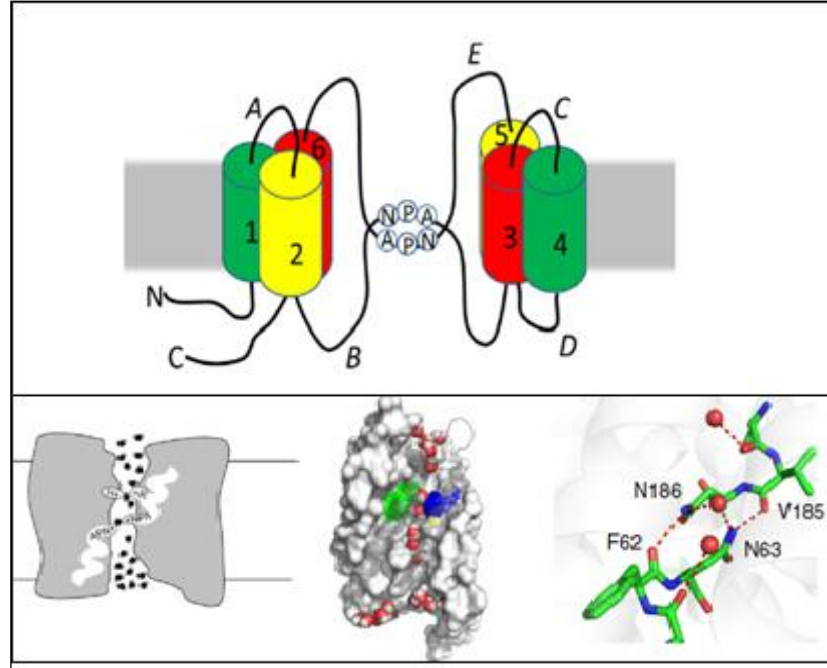
Teorik olarak sudan arınmış iyonlar 2.8 Å çapındaki bir gözeneğe sığabilir. Sudan arınmış bir sodyum iyonunun çapı 1.9 Å'dir. Buna rağmen su ile birleşmiş sodyum iyonlarının çapı 7.16 Å'dir. Dar gözenekli katyon kanalları iyonları susuzlaştırmak için mekanizmalara sahiptir. Buna karşılık, AQP1, gözeneklerin her bir tarafında dört karbonil oksijen atomu içerir. Böylece su moleküllerini çözeltiden çekebilmesine rağmen, kanalın en dar kısmından geçemeyecek olan iyonları kısmen dehidrate edebilir. Tek bir su molekülü sütunu, kanal içindeki 20 Å genişliğinde bulunur [45].

Şekil 2.1'de koyu renkli 4 su molekülü gözenek astarı ile diğer kısımların etkileşimini göstermektedir. Hücre dışı ve hücre içi su molekülleri daha soluk renk ile gösterilmiştir. Üç özellik kanalın suya karşı seçiciliğini belirtir: 1-Boyut kısıtlaması: Kanalın orta noktasının 8 Å yukarısında por çapının 2.8 Å'a (yaklaşık bir su molekül çapı kadar) daralması, 2-Elektrostatik itme: Porun en dar kısmındaki korunmuş yapı (Arg-195) protonlanmış su (H_3O^+) dahil olmak üzere katyonlara bir engel oluşturur. 3-Suyun dipol yapısının yeniden düzenlenmesi: Kanalın orta noktasında iki taraflı heliks yapılar bir araya gelerek su moleküllerini yeniden düzenleyen pozitif yüklü dipolleri bu noktada sağlarlar. Tek sıralı su molekül zincirinde hidrojen bağlarının bozulması proton iletkenliğinin oluşumunu önler [45].



Şekil 2.1: Bir AQP1'in alt birimi içerisindeki kanal yapısının şematik gösterimi (sagittal kesit).

Seçici su kanalı proteinleri olan aquaporinlerin keşfedilmesi, bu proteinlerin yeni membran tipleri için yapı taşları olarak kullanılmasına teşvik oluşturmuştur ve son zamanlarda araştırmalar bu yönde gelişmiştir [13].



Şekil 2.2: Akuaporin monomerinin genel yapısı.

2.5. Akuaporin Bazlı Biyomimetik Membranlar (ABM)

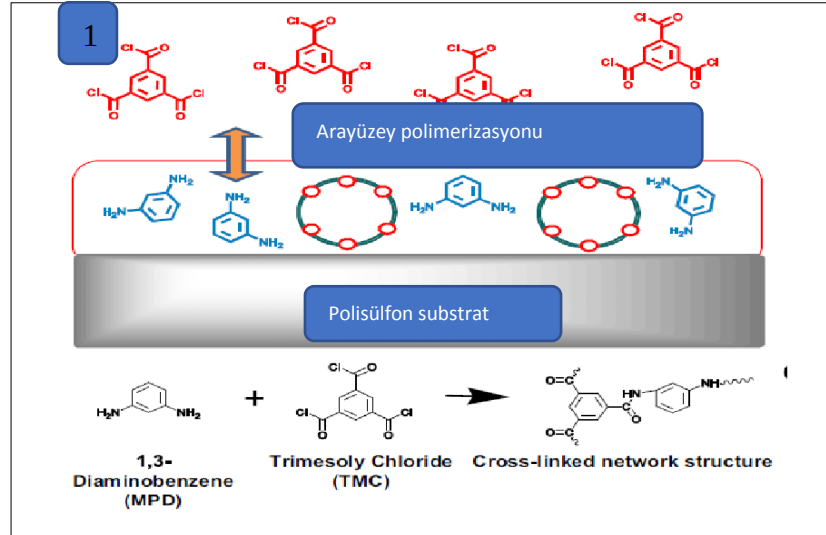
Membran teknolojisindeki sınırlamaların üstesinden gelmek için, yeni membranlar tasarlanmış ve kimyasal veya biyolojik yapılar modifiye edilmiştir. Bu yeni modifikasyonlardan biri, aquaporinlerin membran yapısına dahil edilmesidir. Aquaporinler, archaealar, bakteriler, bitkiler, böcekler ve memeliler dahil olmak üzere her tür organizmada mevcut bulunan iç hücre zarı proteinleri ailesindendirler [48], [49].

Aquaporinlerle hazırlanan biyomimetik membranlar, özellikle desalinasyon işlemleri için tasarlanmış ve üretilmiştir. Yüksek hacimli prosesler için anahtar bir parametre olan membran akısını iyileştirirler. Genellikle, *Escherichia coli* akuaporini olan AqpZ, kolay elde edilmesi nedeniyle çalışmalarda tercih edilir.

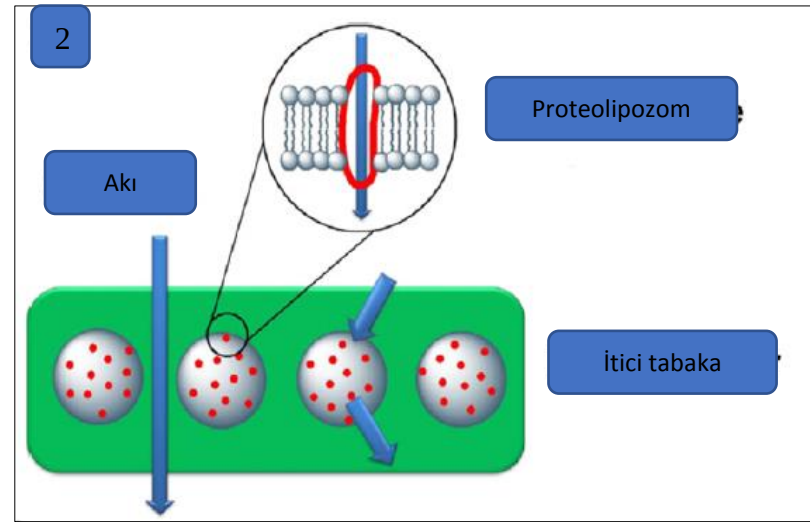
Aquaporinler oldukça iyi su geçirgenliğine ve çözünenleri itme yeteneğine sahip su kanal proteinleridir ve bu özellikleri ile yüksek performanslı biyomimetik

membran hazırlanmasında büyük ilgi görmektedirler. Sürekli artan bu ilgiye rağmen hatasız bir akuaporin bazlı biyomimetik membran (ABM) geliştirmek kolay değildir [4]. Aquaporin bazlı bir membran teknolojisi geliştirmedeki en büyük zorluk, aquaporin proteininin yalnızca birkaç nanometre kalınlığında bir membrana yayılmasından kaynaklanmaktadır. Böyle ultra ince membranlar, önemli baskılara dayanamayacak ve destek yapılar olmadan endüstriyel olarak ölçeklendirilemeyecektir. Membran performansı, ölçeklenebilirlik ve uygun maliyetli üretim sağlanırken, aquaporin proteinlerini uyumlu malzemelere dahil etmek, başarılı bir teknoloji gelişimi için çok önemlidir [13]. Genel olarak, AQP'leri ultra ince bir amfifilik lipid filme veya proteolipozomlara (protein içeren veziküller) dahil ederek doğal hücrel membranları taklit etmek için yapay bir membran geliştirilebilir. Ardından proteolipozomlar, mikro gözenekli bir substrat tarafından desteklenen seçici bir tabakaya dahil edilebilir. İnce film kompozit (TFC) bir ABM hazırlamak için arayüzey polimerizasyon yöntemi kullanılabilir. Bu yöntemde Akuaporin içeren proteolipozomlar m-fenilen-diamin (MPD) sulu çözeltisine ilave edilir. Kontrol membranları ise akuaporinsiz ya da inaktif akuaporinli olarak aynı şekilde hazırlanır. Membranların ayırma performansları ters osmoz deneyleri ile ölçülebilir. 5 bar basınç ile yapılan çapraz akışlı ters osmoz deneylerinde ABM performansının kontrole kıyasla çok daha iyi olduğu görülmüştür. Ayrıca bazı tuzlu su ayırma işlemleri için üretilmiş ticari ters osmoz membranları ile kıyaslandığında da TFC ABM'nin performansı yüksek bulunmuştur. ABM'nin mevcut RO membranlarına kıyasla iki kat daha yüksek bir su geçirgenliğine potansiyel olarak ulaşabileceği tahmin edilmektedir. Buna rağmen, geniş membran alanına sahip hatasız ABM üretmek zordur [4].

Arayüzey polimerizasyon yönteminde tuz iten poliamid tabaka oluşturmak için MPD ve TMC kimyasalları monomer olarak kullanılırken akuaporin içeren proteolipozomlar seçici su kanallarını oluşturmaktadır [4].



Şekil 2.3: Ara yüzey polimerizasyon yöntemi.



Şekil 2.4: Ara yüzey polimerizasyon yöntemi ile oluşturulmuş itme tabakasında lipozomların konumu ve su geçişi.

2.6. Halofilik Bakteriler ve *Halomonas elongata*

Mikrobiyal dünyada birçok ekstremofil bulunur. Ekstremofiller beş kategoriye ayrılabilir; termofiller, asitofiller, alkalifiller, halofiller ve psikrofiller. Bu kategoriler açıkça mikroorganizmaların kullandığı habitatları göstermektedir [50]. Ekstremofilik mikroorganizmaların birçoğu biyoteknolojik ve ticari kullanımlar için uygun özelliklere sahiptir [51]. Ekstremofilik mikroorganizmalardan halofiller, tuz konsantrasyonu, okyanusun tuz konsantrasyonundan beş kat daha fazla olan bölgelerde yaşamlarını sürdürebilirler [52]. Halofiller çok yüksek tuz

konsantrasyonlarına sahip çevrelerde gelişebilen organizmalardır. Tuza dayanıklılıklarına göre halofiller; hafif, orta ve aşırı olarak kategorize edilirler [50]. Gibbons, aşırı halofilik bakterilerin sadece % 15'ten daha fazla (ağırlık/hacim) NaCl içeren çözeltilerde yaşayabildiğini belirtmiştir. Yani bu bakteriler yüksek tuz konsantrasyonlarında hayatta kalırlar. Luria agar besiyerinde opak beyaz renkli koloniler oluştururlar ve tüm suşlar NO_3^- varlığında anaerobik olarak büyüyerek NO_3^- 'ü NO_2^- 'ye indirgerler. Hepsi glikozu fermente ederler ancak sükroz, gliserol, mannoz ve sellobiyozu oksitlerler. Bütün suşlar ornitin ve lisin dekarboksilaz pozitif, katalaz pozitif ve sitokrom oksidaz negatiftir [53]. Son yıllarda, halofilik mikroorganizmaların kullanımı önemli ölçüde artmıştır. Halofillerden gelen birçok enzim, stabilizatör ve değerli bileşikler, biyoteknolojik üretim işlemlerinin geliştirilmesi için avantajlar sunabilir [50].

Halofilik bir bakteri olan *Halomonas elongata*, Bonaire, Hollanda Antilleri'nde, bir güneş tuzu tesisinden izole edilmiştir ve yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayabilen, gram (-) bir bakteridir. *H. elongata* geniş bir tuz konsantrasyonu aralığında hayatta kalabilen dolayısıyla ekstrem koşullara dayanıklı bir bakteri türüdür. Aerobik halofilik bakterilerin çoğu, nitrati alternatif bir elektron alıcısı olarak kullanabilirler. Yani *H. elongata* nitrati nitrite indirgeyerek anaerobik olarak büyüyebilir. Ayrıca *H. elongata*, NaBr ve NaNO_3 içeren besiyerlerinde, NaCl içeren besiyerindeki gibi büyüyebilmektedir. Uygun şartlarda optimum büyüme sıcaklığı 30°C derecedir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, ortam tuzluluğu artışının, *H. elongata*'nın hücre zarı üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hücre duvarı, daha yüksek tuzlulukta iç taraftan daha yoğun ve yapışkan hale gelmektedir [54].

3. MATERİYAL VE METOT

Bu çalışmada *H. elongata* akuaporinleri kullanılarak biyomimetik membran üretilmiştir. Biyomimetik membran üretimi biyolojik membrandaki su transfer mekanizmasının sentetik membrana aktarılmasını içeren. Bu tez çalışmasında kullanılan akuaporinini kodlayan *H. elongata* akuaporin geni daha önce pGEX-4T (klonlama vektörü) vektörüne yerleştirilerek *E. coli* BL21'de klonlanmıştır. Klonlanan gen ifadesi GST-gen füzyon proteini şeklindedir. Daha sonra trombin ile GST bölgesi kesilebilmektedir. GST yaklaşık 26 kDa ağırlığındadır. GST bağlı *H. elongata* akuaporinleri 50 kDa civarında bant oluşturmaktadır [55]. Klonlanan bakteriden akuaporinler saflaştırılmış ve SDS-Page Jel analizi ile kontrol edildikten sonra lipozomlara yerleştirilmiştir. Lipozomlar proteinli ve proteinsiz olarak üretilmiştir ve su geçirgenlikleri akış durduran ışık saçılımı (stopped-flow light scattering) yöntemi ile ölçülmüştür. Daha sonra bu lipozomlar ve proteolipozomlar polisülfon membran yüzeyine ince film rehidrasyon yöntemi ile kaplanmıştır. Proteolipozomların membran yüzeyine kaplanması için ara yüzey polimerizasyon yöntemi ile itici bir tabaka oluşturulmuştur. Akuaporin kaplı membranların akıları ve tuz, glikoz, üre, gliserol itme performansları ters ozmoz prosesi ile belirlenmiştir.

3.1. Akuaporinlerin Hücre Zarından Saflaştırılması

Aquaporinler, Erbakan et al. (2015) 'e göre saflaştırılmıştır [56]. pGEX-4T-HEAQP taşıyan *E. coli* BL21 hücreleri 100 mg/mL ampicilin içeren, 10 mL Luria Broth (LB) besiyerinde, 37 °C'de, bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün çoğalan hücreleri de içeren 10 mL besiyeri, yine ampicilin içeren, 1 L LB besiyerine ekilerek bir gece daha, 37 °C'de, çalkalanarak çoğaltılmıştır. Ertesi gün hücreler 1mM konsantrasyonuna denk gelecek şekilde Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ile 3 saat indüklenmiştir. Böylece hücrelerin akuaporin genini ifadesi hızlandırmıştır. Daha sonra hücreler 8000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür ve süpernatant atılmıştır. Çökmüş hücreleri içeren pellet ise -32 °C'de, 1 gece bekletildikten sonra, uzun bir pipet yardımı ile 5 mL/L Lysis Buffer (1 mM MgSO⁴, 100 mM K₂HPO₄, 1 mM PMSF, 0.02 mg/mL RNase, 1 mg/mL

lysozyme at pH = 7.0) içerisinde çözdürülmüştür. Bu hücreler 4 °C'de, 1 dakikalık periyotlarla 30 dakika tamamlanacak şekilde, sonikatör (Hielscher) ile parçalanmıştır. Hücre kalıntıları ve parçalanmamış hücreler 4 °C'deki santrifüjde, 10.000 x g'de 20 dk çöktürülmüş ve süpernatant ayrılmıştır. Süpernatantın içerisindeki membran proteinlerini çöktürmek amacı ile ultrasantrifüj kullanılmıştır. Ultrasantrifüj işlemi 4 °C'de, 100.000 x g'de 1 saat olarak gerçekleştirilmiştir. Ultrasantrifüjden sonra süpernatant dökülmüş ve pellet bir tampon çözeltide (% 5 Triton-X, 100 mM K_2HPO_4 (pH = 7.0), 200 mM NaCl, % 10 gliserol ve 2 mM β -merkaptoetanol (β ME)) bir gece bekletilmiştir. Bir gece bekleyen numune, hafif karıştırılarak tampon içerisinde çözünmesi sağlandıktan sonra, 0.45 μ m steril filtreden geçirilmiş ve glutation sefarose 4B (GE Healthcare) boncukları ile inkübe edilmiştir. Bu boncuk numune karışımı hacminin 6 katı kadar yıkama çözeltisi ile (100 mM K_2HPO_4 (pH = 7.0), % 1 Triton-X, 200 mM NaCl, % 10 gliserol, 2 mM β ME) yıkanmış ve % 10 gliserol'lü 10 mM Reduced L-glutation içinde ayrıştırılmıştır. Yıkanan protein numunesinin saflığı, SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) jel analizi ile ölçülmüştür.

3.2. SDS-PAGE Jel Analizi

Proteinlerin saflığı SDS-Page jel (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) analizi kullanılarak belirlenmiştir. SDS-Page jel, % 12 ayırma jeli (separating gel) ve % 5 toplama jeli (stacking gel) ile hazırlanmıştır. Saflaştırılmış proteinler Coomassie brilliant blue R250 boyasıyla 6 birim boya / 1 birim protein oranında boyanarak jele yüklenmiştir. Belirteç olarak bir kuyucuğa da marker (ThermoFischer page ruler prestained protein ladder, Fermentas Prestained Protein MW Marker) yüklenmiştir. Güç kaynağından ayırma jeline kadar 100 V, sonrasında ise 200 V voltaj verilerek proteinler jelde yürütülmüştür.

3.3.Lipozom Hazırlama

3.3.1. Protein İçermeyen Lipozom Hazırlama

Lipozomların hazırlanmasında ince film rehidrasyon yöntemi kullanılmıştır. Lipit olarak DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Avanti Polar Lipids INC, Alabama, USA) kullanılmıştır. DOPC, yuvarlak tabanlı cam şişeye hazırlanacak konsantrasyona uygun miktarda konulmuş ve kloroformda çözdürülmüştür. Rehidrasyon işlemi için şişe döndürülerek içerisindeki kloroform buharlaştırılmıştır. N₂ gazı ile tüm kloroform uçurulmuş ve DOPC'nin cam yüzeyde ince bir lipit film oluşturması sağlanmıştır. Bu şekilde 4 °C derecede 1-2 saat daha bekletildikten sonra istenilen son konsantrasyona göre 1X PBS (phosphate buffered saline) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) ile ince film tabaka çözdürülmüştür. Lipitlerin daha iyi çözünmesi için vortex kullanılmıştır. Lipozom boyutlarının aynı olması için çözelti 21 defa Ekstrüder (Avanti Polar Lipids INC, Alabama, USA)'den geçirilmiştir. Ekstrüderin içerisindeki membranın (Whatman, Maidstone, UK) por çapı 200 nm'dir.

3.3.2 Akuaporinli Lipozom Hazırlama

Protein içermeyen lipozom hazırlama aşamaları vortex aşamasına kadar aynıdır. Bu işlemden sonra şişeye akuaporin proteinleri eklenmiştir. Bu protein/lipit oranı 1/200 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca % 1 oranında deterjan yani Octyl β -D-glucopyranoside (OG) (Sigma-Aldrich, USA) eklenmiştir. Bu karışım oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Böylece deterjan lipitlerin yapısını bozmuştur ve akuaporin proteinleri lipozomların içerisine nüfuz edebilmiştir. Daha sonra deterjanı uzaklaştırmak için Bio Beads (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) boncukları kullanılmıştır. Bu boncuklardan önce 0.05 gr eklenmiş ve çalkalayıcıda 1 saat bekletilmiştir. Ardından 0.15 gr daha konularak yine 1 saat çalkalayıcıda bekletilmiştir. Sonra sıvı kısım protein içermeyen lipozom hazırlanışında yapıldığı gibi ekstrüderden geçirilmiştir ve proteolipozomlar hazır hale gelmiştir.

3.3.3. Lipozomların Su Geçirgenliklerinin Tayini

Hazırlanan lipozom veya proteolipozomların su geçirgenliklerini ölçmek için SX20 akış durduran ışık saçılım spektrometre (Applied Photophysics, UK) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.1). Işık kaynağının dalga boyu 590 nm olarak seçilmiştir. Cihazda iki şırınga mevcuttur. Bu şırıngalardan birine lipozom içeren çözelti, diğerine 0.85 M NaCl içeren çözelti konulmuştur. Lipozom çözeltisi, 8 atm azot gazı basınçlı tuzlu su çözeltisi ile karıştırılmıştır. Osmotik basınç farkı sayesinde lipozomlardan su çıkışı olmuştur ve bu su çıkış hızı sayesinde ışık saçılımı meydana gelmiştir. Cihaz, bu ışık saçılımını ölçerek bir grafik oluşturmuştur. Bu grafiğin eğimi olan k değeri hacim ile ilişkili zaman sabitidir ve cihazdan okunarak aşağıdaki eşitlik aracılığı ile lipozom ya da proteolipozom ozmotik geçirgenlikleri (P_f) hesaplanmıştır. PBS içerisinde tuz konsantrasyonu yüksek olduğundan tuzun konsantrasyonundan çıkarılması gereklidir. İletkenlik biriminin $\mu\text{s/cm}$ 'den mg/L 'ye çevrilmesi için 0.64 sabit sayısı ile çarpılmış ve iyon miktarı hesaplanmıştır. 0.85 M NaCl iletkenliği $71197.7 \mu\text{s/cm}$ ve 1 X PBS iletkenliği $15950.2 \mu\text{s/cm}$ 'dir.

Buradan;

Δ iletkenlik,

$$71195.7 \mu\text{s/cm} - 15950.2 \mu\text{s/cm} = 55245.5 \mu\text{s/cm} \quad (3.1)$$

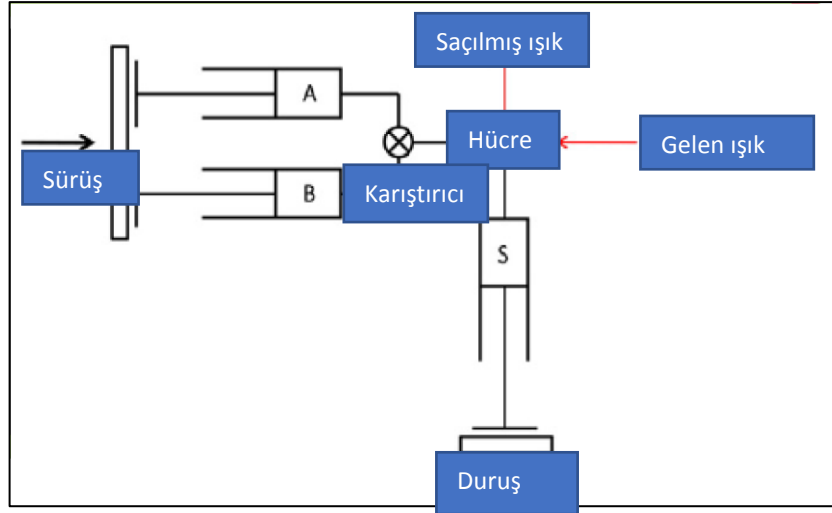
$$55245.5 \mu\text{s/cm} \times 0.64 = 35357.1 \text{ mg/L} = 35.36 \text{ g/L} \quad (3.2)$$

$$[NaCl] = (35.36 \text{ g/L}) / (58.44 \text{ g/mol}) = 0.61 \text{ M} \quad (3.3)$$

NaCl molekülü 2 iyon içerdiği için $\Delta\pi = 1.2 \text{ Osm}$

$$P_f = k / (S/V_o \times V_w \times \Delta Osm) \quad (3.4)$$

Burada S , lipozomların başlangıç yüzey alanı; r , 87.4 nm (200 nm çapındaki protein içermeyen lipozom için Nano Zetasizer ölçüm sonucu); V_o , lipozomların başlangıç hacmi; V_w , suyun kısmi molar hacmi ($18 \text{ cm}^3/\text{mol}$); Δ_{osm} , lipozom içerisindeki sıvı ile lipozom dışarısında bulunan sıvı arasındaki osmolarite farkı ve P_f , ozmotik geçirgenliktir.

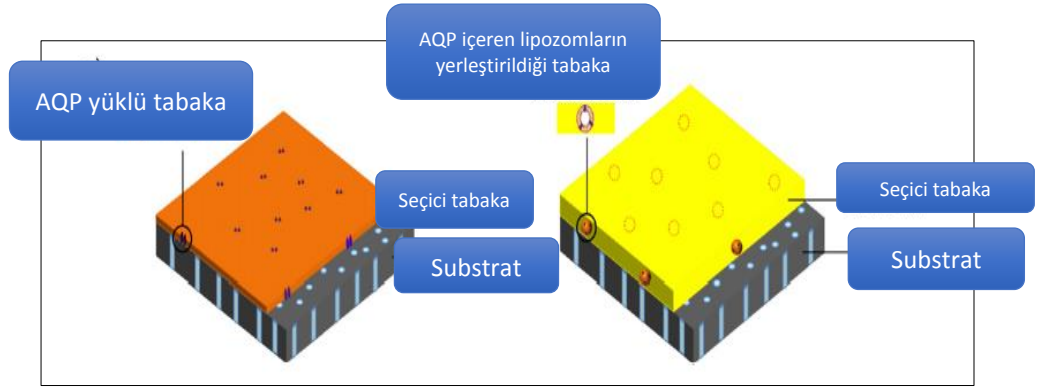


Şekil 3.1: Akış durduran ışık saçılım spektrometre prosesi.

3.4. Proteolipozom İçeren Membran Yapımı

Membran olarak polisülfon membrane (PS) kullanılmıştır. Kaplama yöntemi ara yüzey polimerizasyonudur. Bu yöntem ile PS membran yüzeyinde ince bir kompozit, itici tabaka oluşturulmuş ve lipozomlar bu tabakanın içerisine gömülmüştür. İlk olarak % 1 MPD (m-Phenylene-diamine), % 0,1 SDS (Sodium dodecyl sulfate) ve 1 mg/mL proteolipozom içeren MPD çözeltisi hazırlanmış ve PS substratı bu çözeltiye 10 dakika maruz bırakılmıştır. Sonrasında kaplanmış yüzey horizontal olacak şekilde, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve azot gazı ile tamamen kurutulmuştur. Ardından substrat yüzeyine TMC çözeltisi (n-Heksan içine % 0.1 Trimesoyl chloride) dökülerek itici tabaka oluşturulmuştur. Kaplanan membranlar bir gece akan musluk suyunun altında bekletildikten sonra Milli-Q suda muhafaza edilmiştir.

Kontrol amacı ile proteolipozom içermeyen kaplanmış membran hazırlanırken aynı işlemler uygulanmıştır. Sadece MPD çözeltisine proteolipozom eklenmemiştir.



Şekil 3.2: Proteolipozom içeren membran yapısı.

3.5. Basıncı Ortamda Ölü Uçlu Filtrasyon Hücresi ile (Dead End) Ölçümler

Bu ölçümler için Sterlitech Corporation Ölü uçlu reaktör sistemi (HP4750, USA) kullanılmıştır. Sistemde membran alanı 14.6 cm^2 'dir ve membrandan geçmesi için konulan sıvı miktarı 250 mL'dir. Ölü uçlu reaktör sisteminde bulunan yuvarlak disk ile aynı ölçülerde kesilmiş membran, disk yüzeyine yerleştirilmiş ve ekipmanlar birleştirilmiştir. Sisteme hava içeren basınçlı tüpten 5 ve 10 barlık basınçlar uygulanmıştır. Ölü uçlu reaktör içerisindeki sıvı deney süresince 300 rpm'de karıştırılmıştır. Çıkış sıvısının miktarı hassas terazi ile ölçülmüştür. Aşağıdaki eşitlikler ile membranın akı (J_v) ve itme hızı (J_{SR}) hesaplanmıştır.

$$J_v = V/A \times \Delta t \quad (3.5)$$

$$J_{SR} = (C_{inf} - C_{eff}) \times J_v \quad (3.6)$$

$$A = J_v/(\Delta P - \Delta \pi) \quad (3.7)$$

$$B = (1/R - 1) \times J_v \quad (3.8)$$

$$R = (C_f - C_p)/C_f \quad (3.9)$$

Burada A, su geçirgenliği; B, tuz geçirgenliği; R, itme oranı; ΔP , uygulanan basınç (bar); $\Delta\pi$, membran ozmotik basınç farkı; J_v , membran akısı ($L/m^2.sa$); V, belli bir zamandaki (L) süzüntü hacmi; A, membran alanı (m^2); Δt , deney sisteminin çalışma süresi (sa); J_{SR} , membranın itme hızı; C_{inf} , besleme çözeltisinin konsantrasyonu; C_{eff} , süzüntü çözeltisinin konsantrasyonudur.

3.6. Çözelti Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

3.6.1. Çözeltilerin Tuz Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Çözeltilerin iletkenlikleri, iletkenlik ölçen cihaz ile belirlenerek 0.64 sabit sayısı ile çarpılmış ve mg/L biriminde iyon miktarı hesaplanmıştır.

3.6.2. Çözeltilerin Glikoz ve Gliserol Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Glikoz ve gliserol miktarlarını belirlemek amacı ile Lab Alliance Essence marka HPLC kullanılmıştır. Numuneler HPLC cihazında ölçülmeden önce 0.45 μm 'lik filtreden geçirilmiştir. Deneylerde her ikisi de 45 °C'de çalışan, kolon fırını içine yerleştirilmiş Tessek Polimer Sugar H form 8 μm şeker kolonu ve refraktif indeks detektörü kullanılmıştır. Mobil faz olarak 4 mM sülfürik asit çözeltisi kullanılmış ve akış hızı 0.6 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Cihaza önce ölçmesi gereken maddenin çeşitli konsantrasyonlarında hazırlanmış standart çözeltileri okutulmuştur. Böylece standart grafikler ve eşitlikler elde edilmiştir. Daha sonra ölçmek istediğimiz numunemiz cihaza okutulmuştur. Standart grafikler ve eşitlikler kullanılarak konsantrasyon hesaplanmıştır.

3.6.3 Çözeltilerin Üre Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Üre konsantrasyonlarını belirlemek için ilk olarak üç adet çözelti hazırlanmış ve numaralandırılmıştır.

Çözelti 1: 125 mL 0.25 N sülfürik asit ve 12.5 gr çinko sülfat 1 L saf suda çözülür.

Çözelti 2: 0.75 N sodyum hidroksit çözeltisi hazırlanır.

Çözelti 3: 20 gr p-dimetilaminobenzaldehit % 96'lık 1 L alkol çözeltisine eklenir. Daha sonra 100 mL hidroklorik asit üzerine eklenir ve karıştırılır.

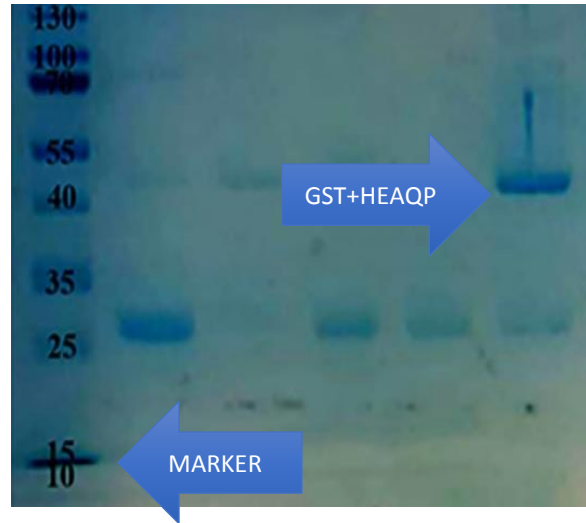
Çözeltiler hazırlandıktan sonra konsantrasyonu hesaplanacak olan numune ve 100 mL'lik bir erlen alınarak karışım işlemlerine başlanmıştır. Erlene 24 mL 1. çözeltiden ve 3 mL numuneden konularak iyice karıştırılmıştır. Sonra 2. Çözeltiden 3 mL eklenmiş ve homojen olana kadar karıştırılmıştır. Oluşturulan yeni çözeltiden 10 mL alınarak 0.45 µm filtreden geçirilmiştir. Bu filtreden geçirilmiş çözeltinin üzerine 10 mL 3. Çözelti eklenmiş ve saf su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. 10 dakika beklendikten sonra spektrometrede, 420 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Üre için hazırlanan standart eğri aşağıda görülmektedir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *H. elongata* Akuaporininin Saflaştırılması

Daha önce *H. elongata* aquaporin geni pGEX-4T (klonlama vektörü) vektörüne yerleştirilerek *E. coli* BL21'de klonlanmıştır [55]. Klonlamadan pGEX-4T-HEAQP olarak ifade edilen proteinler *E. coli* BL21 hücrelerinden metot kısmında anlatıldığı gibi saflaştırılmıştır. Bu işlemde akuaporin proteinleri BL21 hücrelerinin membran kısmından saflaştırılmıştır.

GST-HEAQP elektroforez jele yüklenerek kontrol edilmiştir. Saflaştırılan proteinler GST etiketi ile beraber gelmektedir. GST tek başına 26 kDa ağırlığındadır. GST bağlı *H. elongata* (GST-HEAQP) akuaporinleri yaklaşık 50 kDa civarında bant oluşturmaktadır.

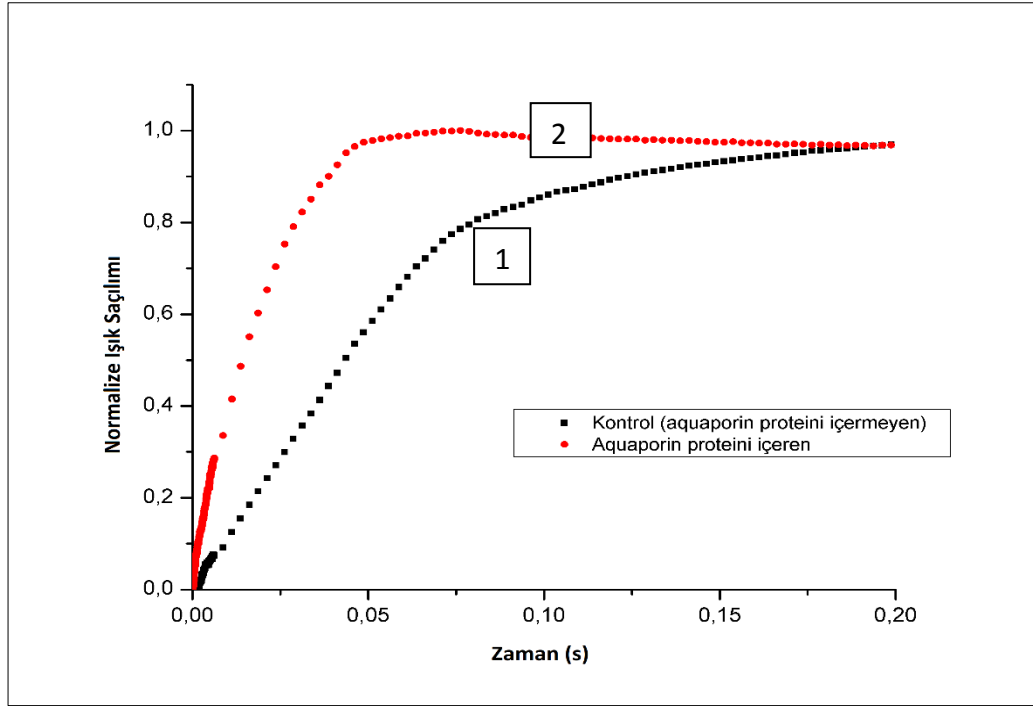


Şekil 4.1: SDS-Page jel üzerinde Marker ve GST-HEAqp monomerlerinin oluşturduğu bantlar 1: Fermentas Prestained Protein MW Marker. 2: GST-HEAQP monomeri.

4.2. Akuaporinlerin Su Geçirgenliklerinin Belirlenmesi

İnce film rehidrasyon yöntemi ile hazırlanmış protein içermeyen lipozomların ve proteolipozomların su geçirgenlikleri SX20 Akış Durduran Işık Saçılımı Spektrometre (Applied Photophysics, UK) cihazı ile ölçülmüştür. Bu cihaz lipozomların suyu bırakma hızlarına göre oluşturdukları ışık saçılımlarını ölçmekte ve zaman sabiti olan k değerini vermektedir. Lipozomların su geçirgenlik hızları bu k değeri ile doğru orantılıdır. Lipozomların üretiminde DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) yağı kullanılmış ve lipozom boyutları 200 nm olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneyde lipozomları içeren çözelti ile 0.85M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. *H. elongata* aquaporini içeren proteolipozomların k değeri protein içermeyen lipozomların k değerine göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.2). Bu sonuç saflaştırılan akuaporin proteinlerinin aktif olduklarını göstermektedir.

Grafiklerdeki eğim, k değeri, ışık saçılımını yani su geçirgenliğini göstermektedir. Akuaporin içeren proteolipozomlarda k değeri kontrole kıyasla daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.2: Protein içermeyen lipozomların (akuaporin içermeyen kontrol) (1) ve HeAQP içeren proteolipozomların (2) 0.85 M NaCl çözeltisindeki zamana bağlı normalize ışık saçılımı grafikleri.

Tablo 4.1’de GST etiketinin tek başına bir etkisinin olup olmadığını görmek için sadece GST etiketi ile hazırlanan lipozomların (+GST negatif kontrol) k değerine bakılmıştır.

Tablo 4.1: DOPC yağı ile hazırlanmış, 200 nm boyutunda, akuaporin içeren ve içermeyen lipozomların su geçirgenliği katsayısı (k) değerleri.

+GST negatif kontrol	-HeAqp içermeyen kontrol lipozom	+HeAqp içeren proteolipozom
12.51 s ⁻¹	17.04 s ⁻¹	55.18 s ⁻¹

Sadece GST etiketi ile hazırlanan lipozomların ve akuaporin içermeyen lipozomların k değerleri, HeAQP içeren lipozomlara göre oldukça düşük çıkmıştır. Yani GST etiketinin ve lipozomların tek başına fonksiyonel olmadığı anlaşılmıştır. Elde ettiğimiz k değeri, su geçirgenliği (P_f) değerinin

hesaplanmasında kullanılmıştır. Ayrıca bu deney ile proteolipozomların GST etiketi ile fonksiyonel oldukları gözlemlenmiştir.

P_f (su geçirgenliği) değerleri Zeta Sizer tarafından ölçülen çaplar ve Akış Durduran Işık Saçılma Spektrometresi ölçümlerinden elde edilen k değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

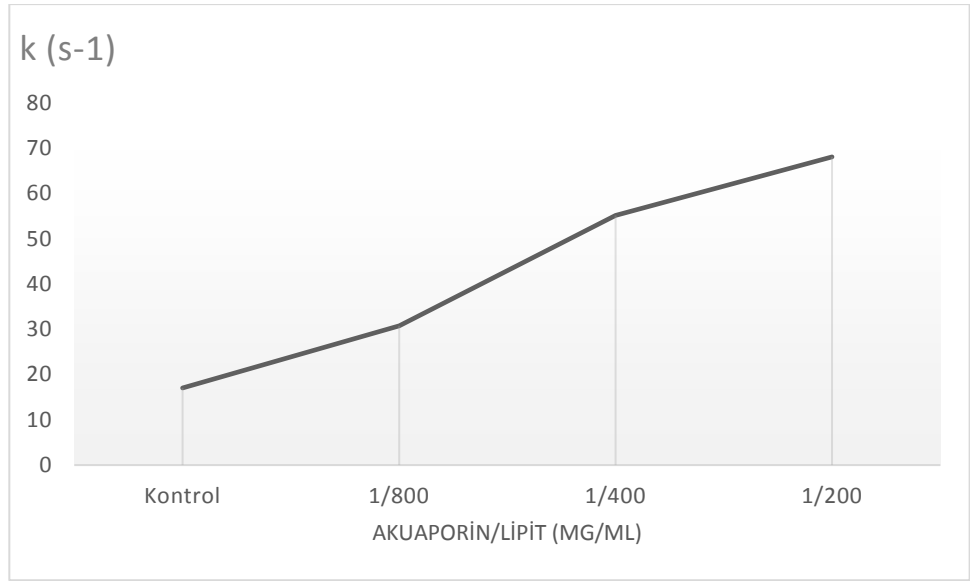
Tablo 4.2: Lipozomların ve proteolipozomların su geçirgenlikleri (P_f).

Protein içermeyen lipozomlar		HEAQP içeren lipozomlar		
Çap (nm) / PdI	Su Geçirgenliği (P_f) ($\times 10^{-3}$ cm/s)	Çap (nm) / PdI	Su Geçirgenliği (P_f) ($\times 10^{-3}$ cm/s)	Tek HEAQP'nin P_f değeri (cm^3/s)
160.27 $\pm$ 3.2/0.2	14.87	150.57 $\pm$ 3.9/0.23	45.2	1.30 $\times 10^{-12}$

Tablo 4.3'te proteolipozomlardaki akuaporin miktarı artışının k değerine etkisini göstermektedir. En yüksek k değeri 1:200 (mg/mL) akuaporin/lipit oranındadır. Deney sonuçları akuaporin oranı arttırıldığında k değerinin, dolayısı ile lipozomların su bırakma hızının arttığını göstermiştir (Şekil 4.3).

Tablo 1.3: Akuaporin/lipit (mg/mL) oranının k (s^{-1}) değerine etkisi.

Akuaporin/lipit (mg/mL)	Kontrol	1/800	1/400	1/200
k (s^{-1})	17.04	30.8	55.18	68.1



Şekil 4.3: Akuaporin/lipit (mg/mL) oranının k (s^{-1}) değerine etkisi.

4.3. HeAQP İçeren Membranların Tuz İtme Ve Su Geçirgenlik Ölçümleri

Deneylerde 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL proteolipozom ile kaplanmış polisülfon membranlar kullanılmıştır. Membran yüzeyinde metot kısmında anlatılan MPD-TMC çözeltileri ile bir itme tabakası oluşturulmuş ve proteolipozomlar bu tabakaya gömülmüştür. Bu membranlardan geçirilmek üzere farklı tuz konsantrasyonlarındaki (10 mM, 100 mM, 800 mM) çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler hazırlanan membranlardan Ölü Uçlu Reaktör kullanılarak geçirilmiştir. Deneyde iki farklı basınç (5 bar ve 10 bar) uygulanmıştır.

Tablo 4.4'te ve Tablo 4.5'te, 5 bar ve 10 bar basınçlarında yapılan deneylerde membranların tuz itme değerleri, akıları, tuz itme hızları (J_{sr}), su ile tuz geçirgenlikleri (A ve B değerleri) yer almaktadır. Kontrol membranı protein içermeyen lipozomlar (BL) yani herhangi bir protein içermeyen lipozomlar ile kaplanmıştır. HL, *H. elongata* akuaporinlerini içeren lipozomların MPD-TMC itme tabakasına yerleştirilmesi ile oluşturulmuş membrandır.

Tablo 4.4'de ve Tablo 4.5'de 10 mM, 100 mM ve 800 mM tuz konsantrasyonlarında kontrol ve akuaporin içeren membranların tuz itme hızları ile akıları yer almaktadır. Bu tabloya göre akuaporin içeren membranların tuz itme

hızları ve akıları, tüm tuz konsantrasyonları için, kontrol (BL) membranlardan yüksektir. Ayrıca tablolarda 5 bar ve 10 bar basınçlardaki veriler de karşılaştırılmıştır. Bu verilere göre basınç arttıkça her iki membranın da tuz itme hızları artmaktadır. Ancak halofilik *H. elongata* akuaporini içeren membranın tuz itme hızı, tuz konsantrasyonu arttıkça iyileşmekte ve akuaporin içermeyen (BL) membran ile arasındaki fark oldukça artmaktadır. Akuaporinli membran tuz itme hızına göre en iyi performansı 800 mM tuz konsantrasyonunda göstermiştir. Kararlı akıya baktığımızda basınç arttıkça biyomimetik membranın kararlı akısının arttığı görülmektedir. Ancak aynı yorum kontrol membran için geçerli değildir.

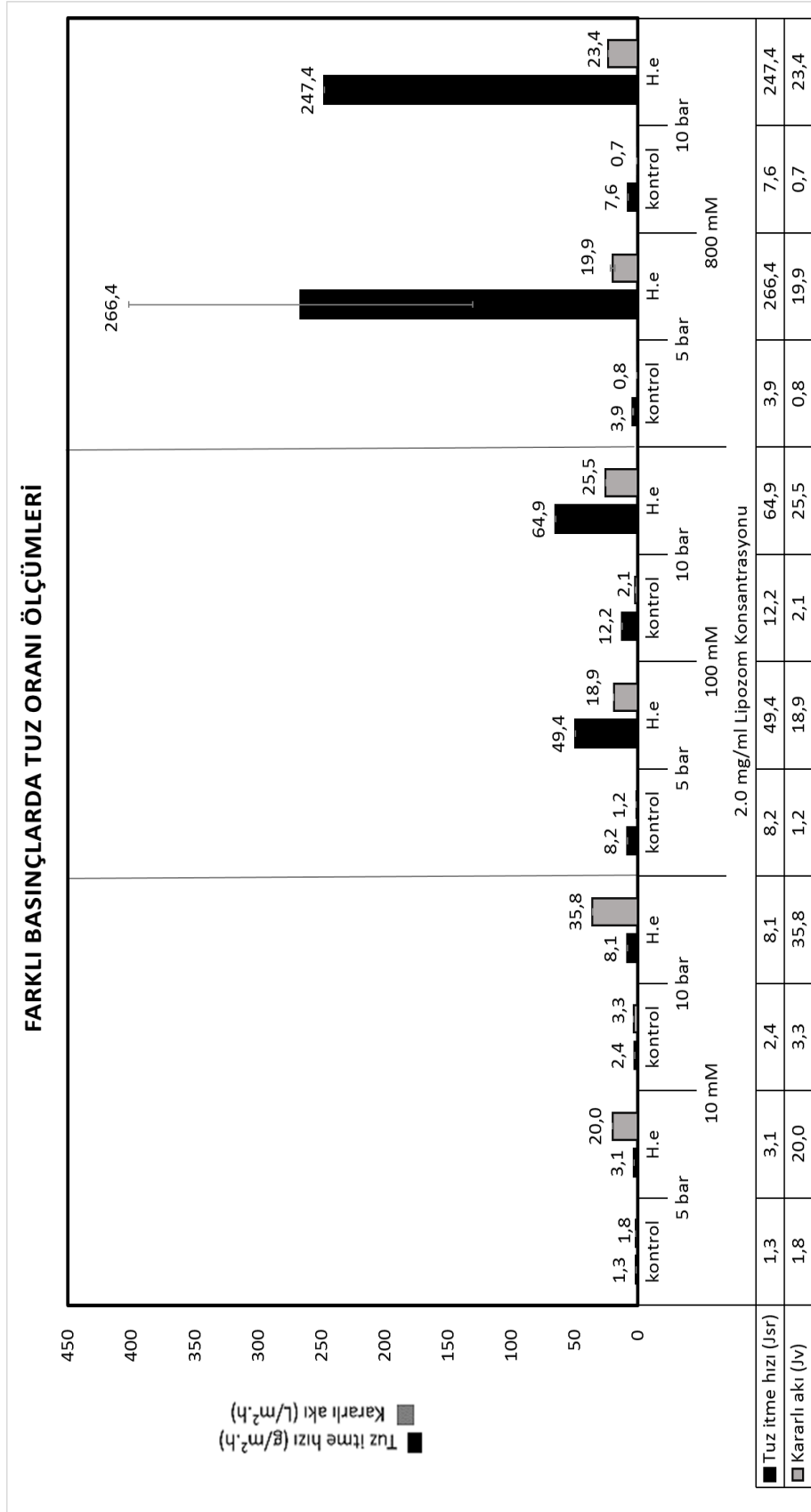
Tablo 4.4: 5 bar basınç altında, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL lipozom konsantrasyonlarında, protein içermeyen lipozom ve akuaporin içeren lipozom ile kaplı membranların filtrasyon parametreleri (BL: protein içermeyen lipozom ile kaplı membran, HL: *H. elongata* akuaporini içeren lipozom ile kaplı membran).

5 bar	Tuz itme (rejection)	Akı (Jv) LMH	$\Delta\pi$	Tuz itme hızları (Js _r) g /m ² .sa	Su geçirgenliği (A)	Tuz geçirgenliği (B)	B/A
10mM							
0.5 BL	0.76	2.47	0.02	1.43	0.49	0.76	1.54
0.5 HL	0.66	4.93	0.02	2.56	0.99	2.58	2.60
1 BL	0.69± 0.01	4.38±0.39	0.02	2.4±0.1	0.88	1.95	2.21
1 HL	0.39±0.07	9.59±0.77	0.02	2.9±0.8	1.92	15.16	7.88
2 BL	0.82	1.76	0.02	1.12	0.35	0.40	1.12
2 HL	0.44	19.96	0.02	6.89	4.01	25.26	6.31
100 Mm							
0.5 BL	0.55	2.05	0.16	7.31	0.42	1.71	4.02
0.5 HL	0.40	2.47	0.16	6.36	0.51	3.74	7.35
1 BL	0.52±0.02	3.58±1.58	0.16	13.1±5.8	0.74	3.28	4.43
1 HL	0.42±0.03	6.75±2.08	0.16	18.2±5.6	1.40	9.33	6.68
2 BL	0.97	1.23	0.16	8.19	0.25	0.04	0.16
2 HL	0.37	18.90	0.16	49.36	3.91	31.65	8.10
800mM							
0.5 BL	0.40±0.001	1.24±0.007	1.30	22.18±0.57	0.33	1.88	5.61
0.5 HL	0.40±0.03	3.4±1.32	1.30	62.19±27	0.92	5.18	5.63
1 BL	0.09±0.07	1.48±0.54	1.30	6.8±6.8	0.40	14.87	37.16
1 HL	0.31±0.05	7.05±0.92	1.30	98.1±25.9	1.90	15.44	8.11
2 BL	0.10±0.01	0.83±0.01	1.30	3.89±0.3	0.22	7.12	31.91
2 HL	0.29±0.12	19.93±2	1.30	266.43±135.76	5.38	49.26	9.15

Tablo 4.5: 10 bar basınç altında, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL lipozom konsantrasyonlarında, protein içermeyen lipozom ve *H. elongata* proteini içeren membranların filtrasyon parametreleri.

10 bar	Tuz itme (rejection)	Akı (Jv) LMH	$\Delta\pi$	Tuz itme hızları g /m ² .sa	A	B	A/B
10mM							
0.5 BL	0.82	5.75	0.02	3.71	0.58	1.24	0.47
0.5 HL	0.65	8.22	0.02	4.24	0.82	4.35	0.19
2 BL	0.92	3.29	0.02	2.41	0.33	0.29	1.15
2 HL	0.29	35.75	0.02	8.08	3.58	86.29	0.04
100 Mm							
0.5 BL	0.66	4.11	0.16	17.78	0.42	2.07	0.20
0.5 HL	0.58	5.75	0.16	24.60	0.58	4.19	0.14
2 BL	0.85	2.05	0.16	12.16	0.21	0.37	0.57
2 HL	0.37	25.48	0.16	64.90	2.59	43.79	0.06
800mM							
2 BL	0.25	0.70	1.60	7.57	0.08	2.15	0.04
2 HL	0.23	23.42	1.60	247.36	2.79	76.80	0.04

Düşük tuz konsantrasyonlarında (10 mM, 100 mM), akuaporinle kaplı membranların tuz itme değerleri (rejection), kontrol membrana göre düşük bulunmuştur. Ancak akuaporinle kaplı membranların akıları yüksek olduğu için tuz itme hızları (Js_r) kontrol membrandan daha yüksektir. Örneğin, 100 mM tuz ve 2 mg/mL lipozom konsantrasyonlarında, kontrol membranın tuz itme hızı 8.19 g/m².sa iken, akuaporinle kaplı membranın 49.36 g/m².sa bulunmuştur. 800 Mm tuz konsantrasyonunda ise, 5 barda akuaporin kaplı membranın tuz itme değeri, 1 mg/mL ve 2 mg/mL lipozom konsantrasyonlarında kontrol membrandan daha yüksek bulunmuştur. Akuaporin ile kaplı membran için en yüksek tuz itme değerleri, 800 mM tuz konsantrasyonunda ve 2 mg/mL lipozom konsantrasyonunda elde edilmiştir.



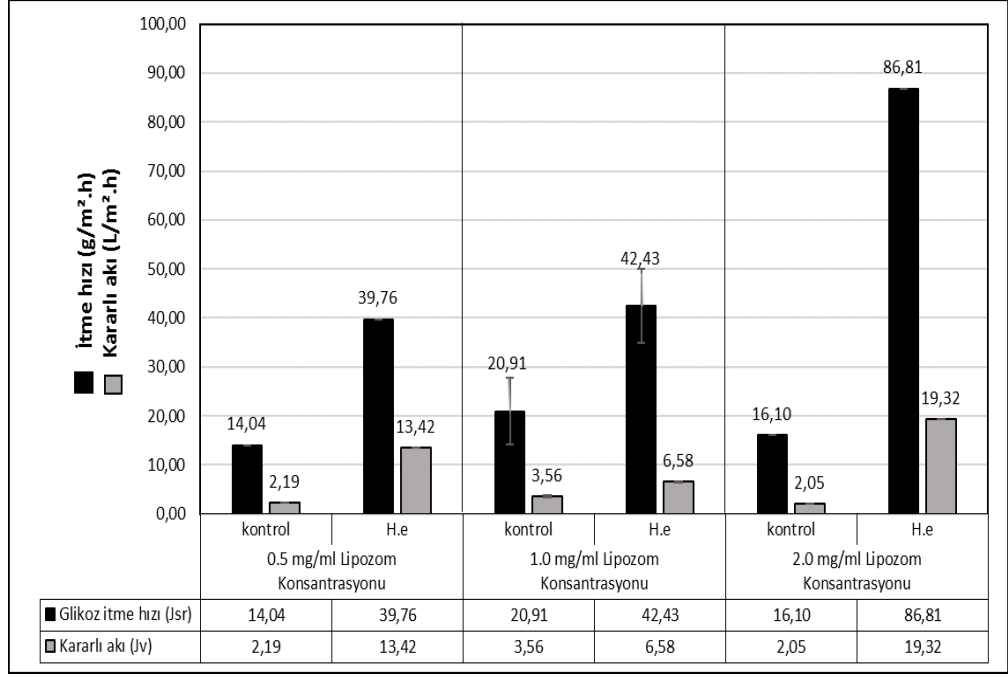
Şekil 4.4: Akuaporin (2 mg/mL) içeren membranların 5 bar ve 10 bar basınç uygulamasında su geçirgenlikleri ve tuz itme hızları.

Tablo 4.6’da ve Şekil 4.5’teki grafikte farklı akuaporin konsantrasyonları (0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL) ile yapılmış membranların glikoz itme

kapasitelerini gösteren deney sonuçları bulunmaktadır. Bu verilere göre en iyi sonuç 2 mg/mL akuaporin içeren proteolipozomlarla kaplanmış membranlarda elde edilmiştir. Akuaporin içeren membranlarda % R değeri düşerken su akışı artmaktadır. Bu da glikoz itme hızına olumlu yansımaktadır. Örneğin 2 mg/mL proteolipozom konsantrasyonunda *H. elongata* akuaporini içeren membranın glikoz itme hızı 86 g/m².sa çıkmıştır. Kontrol ise saatte metrekare başına 16.1 g glikoz itebilmiştir.

Tablo 4.6: 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL proteolipozom konsantrasyonlarında, kontrol ve akuaporinli membranların glikoz filtrasyon parametreleri.

Proteolipozom yoğunluğu (mg/mL)	Glikoz itme (% R)	Glikoz itme hızı (Js _r) (g /m ² .sa)	Akı (Jv)	A	B
0.5 BL (kontrol)	0.6	14.0	2.2	0.6	1.2
0.5 HL	0.2	39.76	13.4	3.6	47.6
1 BL (kontrol)	0.59 ± 0.14	20.91 ± 6.82	3.56 ± 1.16	0.94	2.43
1 HL	0.58 ± 0.1	42.43 ± 7.50	6.58 ± 1.16	1.74	4.80
2 BL (kontrol)	0.78	16.1	2.05	0.54	0.57
2 HL	0.45	86.81	19.32	5.11	23.66



Şekil 4.5: 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL lipozom/proteolipozom içeren kontrol ve akuaporinli membranların glukoz itme hızları ve kararlı akıları.

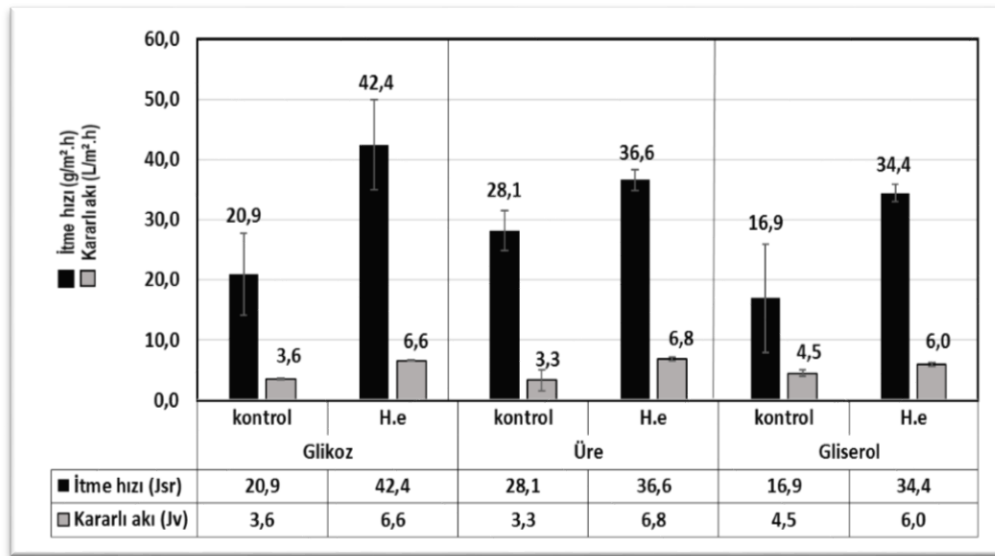
Tablo 4.7’de ve Tablo 4.8’de 1 mg/mL proteolipozom konsantrasyonunda kaplanmış membranların üre ve gliserol ölçüm sonuçları verilmiştir. Bu verilere göre itme hızları ve akılar bakımından halofilik akuaporin içeren membran daha yüksek performans göstermiştir. Akuaporin içeren membranların çözünür madde itme değeri düşmemiş ancak solüsyon geçirme hızları artmıştır. Kontrol membranı saatte 28.1 g/m^2 üre iterken akuaporinli membran saatte 36.6 g/m^2 üre itmiştir. *H. elongata* akuaporini içeren membranın gliserol itme kapasitesi farkedilir derecede artmıştır. Kontrol membranı 16.9 g/m^2 .sa iterken akuaporin içeren membran 34.4 g/m^2 .sa gliserol itmiştir.

Tablo 4.7: 1 mg/mL lipozom/proteolipozom içeren kontrol ve akuaporinli membranların üre filtrasyon parametreleri.

	Üre itme (% R)	Üre itme hızı (Jsr) (g/m^2 .sa)	Akı (Jv) (L/m^2 .sa)	A	B
BL (kontrol)	0.52 ± 0.16	28.14 ± 3.32	3.29 ± 1.74	3.74	3.02
HL	0.51 ± 0.12	36.60 ± 1.78	6.78 ± 0.29	7.71	6.44

Tablo 4.8: 1 mg/mL lipozom/proteolipozom içeren kontrol ve akuaporinli membranların gliserol filtrasyon parametreleri.

Lipozomlar	Gliserol itme (% R)	Gliserol itme hızı (Js _r) (g /m ² .sa)	Ak _ı (J _v) (L/m ² .sa)	A	B
BL (kontrol)	0.5 ± 0.1	16.93 ± 8.98	4.48 ± 0.53	2.2	4.5 3
HL	0.51 ± 0.09	34.43 ± 1.48	5.96 ± 0.29	2.92	5.7 5



Şekil 4.6: 1 mg/mL proteolipozom konsantrasyonlarında hazırlanan kontrol ve akuaporinli membranların glikoz, üre ve gliserol itme hızları ve kararlı akıları.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında *H. elongata* akuaporini kullanılarak hazırlanan nanofiltrasyon membranının tuz, glikoz, üre ve gliserol itme kapasitesi belirlenmiştir. Bu çözünür maddelerin solüsyonlardan uzaklaştırılmasında akuaporin içeren biyomimetik membranların kullanım kapasitesi araştırılmıştır. Akuaporinler sadece suyun geçişine izin veren, diğer tüm çözünürlerin hücre içine girişini engelleyen membran transfer proteinleridir. Akuaporinlerin çözünür maddeleri itme özellikleri değişik özelliklere sahip membranların üretimi için kullanılmıştır. Akuaporinli ters ozmoz (RO) membranlarının desalinasyon prosesindeki potansiyelleri daha önceki birçok çalışmada araştırılmıştır [42], [57]. RO membranları içme suyu arıtımında yaygın şekilde kullanılmaktadırlar [58]. RO membranların monovalent iyonları itme kapasitesi % 98'den daha yüksektir [59], ancak küçük organik molekülleri itme kapasitesinin % 80'in altında olduğu belirtilmiştir [60], [61]. Bu çalışmada hazırlanan biyomimetik RO membranının %1 konsantrasyonda organik çözünür madde itme kapasitesi % 50 civarında tespit edilmiştir. Membrana akuaporin yerleştirilmesi membranın % itme kapasitesini iyileştirmemiştir. % itme kapasitesi zamana ve su akısına bağlı olmayan itme kapasitesidir. Ancak akuaporin içeren membranların su akılarındaki yükselme zamana bağlı çözünür madde arıtımını farkedilir derecede artırmıştır. İdeal bir desalinasyon membranında A değerinin yüksek B değerinin ise sıfıra yakın olması beklenir. Böyle bir membran suyu hızlı akıtırken çözünür maddeyi de geçirmez. Ancak böyle bir membran üretmek çok zordur. Membranın su ve çözünür madde geçirgenliği doğrusal olmayabilir, komplike bir olgudur, birçok parametreye bağlı olabilir, membranın su akı derecesi bunlardan biridir. Werber *et. al*, sabit bir B değerinde A'nın yükselmesi ancak düşük akılarda gerçekleşebileceğini belirtmiştir [62]. Bir membranın artılmak istenen maddeyi geçirmemesi oldukça önemlidir ancak membran ile gerçekleştirilebilecek proses hacmi de önemlidir. Çözünür maddeyi hiç geçirmeyen bir membranın akısının çok düşük olması proses süresini uzatır, dolayısıyla maliyeti artırır. Bu çalışmada *H. elongata* içeren membranların yüksek akıları birim zamanda çözünür madde itme kapasitelerinin yüksek olmasını sağlamıştır. Membran akısı *H. elongata* akuaporini ile 6.58 LMH'den 19.2 LMH değerine yükselmiştir. Öztürk (2019) tarafından yapılan

çalışmada *E. coli* akuaporini ile hazırlanan membranların tuz ve organik çözünür maddeleri itme kapasiteleri incelenmiştir. *E. coli* ve *H. elongata* akuaporinlerinin organik çözücülerini itme kapasiteleri kıyaslanacak olursa, *E. coli* akuaporininin üre ve gliserolü itme işinde bir etkisi olmadığı söylenebilir. *H. elongata* akuaporini içeren membranın gliserol itme kapasitesi diğer organik çözünlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Gliserol bir miktar polar bir madde olmasına rağmen yağda çözünür, bu nedenle hücre membranından geçebilir. Ancak glukoz polardır ve hücre membranından geçemez. *H. elongata* akuaporinine kıyasla *E. coli* akuaporininin polar maddelere daha spesifik olduğu söylenebilir; *E. coli* akuaporini içeren membranın glüköz itme kapasitesi daha yüksek bulunmuştur. Üre ise küçük ve polar olmayan bir maddedir, bu nedenle akuaporinlerin üre itme performansları düşük bulunmuştur.

Akuaporinlerin seçiciliğinde birçok faktör rol oynar. Sadece çözünür madde-kanal etkileşimi değil su-kanal etkileşimi de akuaporinlerin seçicilik mekanizmasının altında yatan önemli bir kriterdir. Seçicilik sterik etki ve hidrofobik etkiye de bağlıdır [48]. Akuaporinlerin transport mekanizmalarının aydınlatılması çok çeşitli medikal ve çevresel uygulamalarda kullanılabilecek membranların üretimine olanak sağlayabilir. Örneğin biyodizel üretiminde gliserolün giderimi zor bir işlemdir. Bunun için gliserolü iten seramik membranlar üretilmiştir [18], [20], [63]. Bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalar gliserol itme kapasitesi yüksek membranların yapımında *H. elongata* akuaporininin yüksek bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Tang C., Wang Z., Petrić I., Fane A.G., Hélix-Nielsen C., (2015), "Biomimetic aquaporin membranes coming of age", *Desalination*, 368, 89-105.
- [2] Degefu M.D., Weijun H., Zaiyi L., Liang Y., Zhengwei H., Min A., (2018), "Mapping Monthly Water Scarcity in Global Transboundary Basins at Country-Basin Mesh Based Spatial Resolution", *Scientific Reports*, 8, 2144.
- [3] Mulder M., (1996), "Basic principles of membrane technology", 2nd Edition, Springer Science & Business Media.
- [4] Zhao Y., Qiu C., Li X., Vararattanavech A., Shen W., Torres J., Hélix-Nielsen C., Wang R., Hu X., Fane A. G., Tang C. Y., (2012), "Synthesis of robust and high-performance aquaporin-based biomimetic membranes by interfacial polymerization-membrane preparation and RO performance characterization", *Journal of Membrane Science*, 423–424, 422-428.
- [5] Kumar M., Grzelakowski M., Zilles J., Clark M., Meier W., (2007), "Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (52), 20719-20724.
- [6] Coday B.D., Cath T.Y., (2014), "Forward osmosis: novel desalination of produced water and fracturing flowback", *Journal of American Water Works Association*, 106:1, E55–E66.
- [7] Shen Y-X., Saboe P.O., Sines I.T., Erbakan M., Kumar M., (2014), "Biomimetic membranes: A review", *Journal of Membrane Science*, 454, 359–381.
- [8] Kennedy E., Fechey-Lippens D., Hsiung B.K., Niewiarowski P.H., Kolodziej M., (2015), "Biomimicry: A Path to Sustainable Innovation", *Massachusetts Institute of Technology*, 31 (3), 66-73.
- [9] Zari M.P., (2007), "Biomimetic Approaches to Architectural Design for Increased Sustainability.", *School of Architecture, Victoria University*, SB07, 033.
- [10] Carstensen F., Apel A., Wessling M., (2012), "In Situ Product Recovery: Submerged Membranes Vs. External Loop Membranes.", *Journal of Membrane Science*, 394, 1–36.
- [11] Van der Bruggen B., Mänttari M., Nyström M., (2008), "Drawbacks of applying nanofiltration and how to avoid them: a review.", *Separation and Purification Technology*, 63 (2), 251–263.

- [12] Waypa J.J., Elimelech M., Hering J.G., (1997), "Arsenic removal by RO and NF membranes.", *American Water Works Association. Journal*, 89 (10), 102–114.
- [13] Tang C., Wang Z., Petrinic I., Fane A.G., Nielsen C.H., (2015), "Biomimetic aquaporin membranes coming of age", *Desalination*, 368, 89-105.
- [14] D'Sauza N. M., Mawson A. J., "Membrane Cleaning in Dairy Industry: A Review.", (2007), *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 45 (2), 125-134.
- [15] Qin L., Zhang Y., Xu Z., Zhang G., (2018), "Advanced Membrane Bioreactors Systems: New Materials and Hybrid Process Design.", *Bioresource Technology*, 269, 476-488.
- [16] Xiao K., Xu Y., Liang S., Lei T., Sun J., Wen X., Zhang H., Chen C., Huang X., "Engineering Application of Membrane Bioreactor for Wastewater Treatment in China: Current State and Future Prospect.", (2014), *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 8 (6), 805–819.
- [17] Ahmed F. N., Lan C. Q., (2012), "Treatment of Landfill Leachate Using Membrane Bioreactors: A Review.", *Desalination*, 287, 41–54.
- [18] Wang Y., Wang X., Liu Y., Ou S., Tan Y., Tang S., (2009), "Refining of Biodiesel by Ceramic Membrane Separation.", *Fuel Process Technology Journal*, 90 (3), 422–427.
- [19] Atadashi I., Aroua M., Aziz A. A., Sulaiman N., (2011), "Membrane Biodiesel Production and Refining Technology: A Critical Review.", *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 15 (9), 5051–5062.
- [20] BANSOD P., Rathod D., (2018), "Polyacronitrile Ultra Filtration Membranes Used for Separation of Glycerol from Transesterification Process of Biodiesel Production.", *Asian Journal of Nanosciences and Materials*, 1, 157–165.
- [21] Charcosset C., (2006), "Membrane Processes in Biotechnology: An Overview.", *Biotechnology Advances*, 24 (5), 482–492.
- [22] Heath C., Belfort G., (1990), "Membranes and Bioreactors.", *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 22 (8), 823–835.
- [23] Mawson A., (1997), "Regeneration of Cleaning and Processing Solutions Using Membrane Technologies.", *Trends in Food Science and Technology*, 1 (8), 7–13.
- [24] Daufin G., Escudier J.-P., Carrere H., Berot S., Fillaudeau L., Decloux M., (2001), "Recent and Emerging Applications of Membrane Processes in the Food and Dairy Industry.", *Food and Bioproducts Processing*, 79 (2), 89–102.

- [25] Nazir A., Khan K., Maan A., Zia R., Giorno L., Schroen K., (2019), "Membrane Separation Technology for the Recovery of Nutraceuticals from Food Industrial Streams.", *Trends in Food Science and Technology*, 86, 426-438.
- [26] Wang X.L., Fanga Y.Y., Tua C.H., Van der Bruggen B., (2012), "Modelling of the separation performance and electrokinetic properties of nanofiltration membranes.", *International Reviews in Physical Chemistry*, 31 (1), 111–130.
- [27] Cath T.Y., Childress A.E., Elimelech M., (2006), "Forward osmosis: principles, applications, and recent developments.", *Journal of Membrane Science*. 281, 70–87.
- [28] Achilli A., Cath T.Y., Marchand E.A., Childress A.E., (2009), "The forward osmosis membrane bioreactor: a low fouling alternative to MBR processes.", *Desalination*, 239, 10–21.
- [29] Hickenbottom K.L., Hancock N.T., Hutchings N.R., Appleton E.W., Beaudry E.G., Xu P., Cath T.Y., (2013), "Forward osmosis treatment of drilling mud and fracturing wastewater from oil and gas operations.", *Desalination*, 312, 60–66.
- [30] Chowdhury M.R., Ren J., Reimund K., McCutcheon J.R., (2017), "A hybrid dead end/crossflow forward osmosis system for evaluating osmotic flux performance at high recovery of produced water.", *Desalination*, 421, 127-134.
- [31] Zhu H., Zhang L., Wen X., Huang X., (2012), "Feasibility of applying forward osmosis to the simultaneous thickening, digestion, and direct dewatering of waste activated sludge.", *Bioresource Technology*, 113, 207–213.
- [32] Holloway R.W., Childress A.E., Dennett K.E., Cath T.Y., (2007), "Forward osmosis for concentration of anaerobic digester centrate.", *Water Research*, 41, 4005–4014.
- [33] Tong T., Elimelech M., (2016), "The global rise of zero liquid discharge for wastewater management: drivers, technologies, and future directions.", *Environmental Science & Technology*, 50, 6846–6855.
- [34] Chekli L., Phuntsho S., Kim J.E., Kim J., Choi J.Y., Choi J.-S., Kim S., Kim J.H., Hong S., Sohn J., Shon H.K., (2016), "A comprehensive review of hybrid forward osmosis systems: performance, applications and future prospects.", *Journal of Membrane Science*, 497, 430–449.
- [35] Baker R., (2012), "Membrane Technology and Applications.", 3rd edition, Membrane Technology and Research.

- [36] Ren J., McCutcheon J. R., (2018), “A new commercial biomimetic hollow fiber membrane for forward osmosis.”, *Desalination*, 442, 44–50.
- [37] Bowen W.R., (2006), “Biomimetic separations learning from the early development of biological membranes.”, *Desalination*, 199, 225–227.
- [38] Sönmez M., (2015), “Küçük Sahil Yerleşimlerinde Su Temininde Çoklu Karar Analizleriyle Desalinasyon Teknolojisinin Entegrasyonu.”, (501081745) Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.
- [39] Charcosset C., (2009), “A review of membrane processes and renewable energies for desalination”’, *Desalination*, 245, 214–231.
- [40] Gomes D., Agasse A., Thiébaud P., Delrot S., Gerós H., Chaumont F., (2009), “Aquaporins are Multifunctional Water and Solute Transporters Highly Divergent in Living Organisms.”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(6), 1213–1228.
- [41] Öztürk A., Yıldız A., Yılmaz H., Ergenekon P., Özkan M., (2019), “Organic solute rejection capacities of *Escherichia coli* and *Halomonas elongata* aquaporin incorporated nanofiltration membranes.”, *Separation Science and Technology*, 0149-6395 ,1520-5754.
- [42] Wagh P., Parungao G., Viola R.E., Escobar I.C., (2015), “A new technique to fabricate high-performance biologically inspired membranes for water treatment.”’, *Separation and Purification Technology*, 156 (2015) 754-765.
- [43] Qi S., Wang R., Chaitra G. K. M., Torres J., Hu X., Fane A. G., (2016), “Aquaporin-based biomimetic reverse osmosis membranes: Stability and longterm performance”, *Journal of Membrane Science*, 508, 94-103.
- [44] Yasui M., (2004), “Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: structure and function of aquaporins.”, *Journal of pharmacological sciences*, 96 (3), 260-263.
- [45] Kozono D., Yasui M., King L.S., Agre P., (2002), “Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine.”, *Journal of Clinical Investigation*, 109 (2002), 1395–1399.
- [46] Verkman A., Mitra A. K., (2000), “Structure and function of aquaporin water channels.”, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 278 (1), F13-F28.
- [47] Zhang R., Skach W., Hasegawa H., Van Hock A.N., Verkman A.S., (1993), “Cloning, Functional Analysis and Cell Localization of a Kidney Proximal Tubule Water Transporter Homologous to CHIP28.”, *The Journal of Cell Biology*, 120 (2), 359-369.

- [48] Hub J. S., De Groot B. L., (2008), "Mechanism of Selectivity in Aquaporins and Aquaglyceroporins.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (4), 1198–1203.
- [49] Zeidel M. L., Ambudkar S. V., Smith B. L., Agre P., (1992), "Reconstitution of Functional Water Channels in Liposomes Containing Purified Red Cell CHIP28 Protein.", *Biochemistry*, 31 (33), 7436–7440.
- [50] Aneela R., Ahmed I., Iqbal M., Jamil M., (2012), "Preliminary Isolation and Characterization Of Halotolerant and Halophilic Bacteria From Salt Mines of Karak, Pakistan.", *Pakistan Journal of Botany*, 44, 365-370.
- [51] Tango M.S.A., Islam M.R., (2002), "Potential for extremophiles for biotechnological and petroleum applications.", *Energy Sources*, 24, 543-559.
- [52] Miteva V.I., Sheridan P.P., and Brenchley J.E., (2004), "Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core.", *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 202-213.
- [53] Vreeland R.H., Litchfield C.D., Martin E.L., Elliot E., (1980), "*Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30 (2), 485-495.
- [54] Ventosa A., Nieto J.J., Oren A., (1998), "Microbiology and Molecular Biology Reviews: Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria", *American Society for Microbiology*, 62, 504-544.
- [55] Özdemir G.Ö., (2017), "Improving the salt rejection potential of membranes by using channel protein aquaporin of halophilic bacterium, *Halomonas elongata*.", *Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi*.
- [56] Shen Y.-x., Si W., Erbakan M., Decker K., De Zorzi R., Saboe P. O., Kang Y. J., Majd S., Butler P. J., Walz T., Aksimentiev A., Houb J., Kumar M., (2015), "Highly permeable artificial water channels that can self-assemble into two-dimensional arrays artificial water channels that can self-assemble into two-dimensional arrays.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (32), 9810-9815.
- [57] Xie W., He F., Wang B., Chung T.-S., Jeyaseelan K., Armugam A., Tong Y. W., (2013), "An Aquaporin-based Vesicle-embedded Polymeric Membrane for Low Energy Water Filtration.", *Journal of Materials Chemistry A*, 1 (26), 7592–7600.
- [58] Lee K. P., Arnot T. C., Mattia D., (2011), "A Review of Reverse Osmosis Membrane Materials for Desalination Development to Date and Future Potential.", *Journal of Membrane Science*, 370(1–2), 1–22.

- [59]Lipp P., Gimbel R., Frimmel F. H., (1994), “Parameters Influencing the Rejection Properties of FT30 Membranes.”, *Journal of Membrane Science*, 95 (2), 185–197.
- [60]Shen M., Keten S., Lueptow R. M., (2016), “Rejection Mechanisms for Contaminants in Polyamide Reverse Osmosis Membranes.”, *Journal of Membrane Science*, 509, 36–47.
- [61]Yoon Y., Lueptow R. M., (2005), “Removal of Organic Contaminants by RO and NF Membranes.”, *Journal of Membrane Science*, 261(1–2), 76–86.
- [62]Werber J. R., Deshmukh A., Elimelech M., (2016), “The Critical Need for Increased Selectivity, Not Increased Water Permeability, for Desalination Membranes.”, *Environmental Science & Technology Letters*, 3 (4), 112–120.
- [63]Gomes M. C. S., Arroyo P. A., Pereira N. C., (2015), “Influence of Oil Quality on Biodiesel Purification by Ultrafiltration.”, *Journal of Membrane Science*, 496, 242–249.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşen YILDIZ 1990 yılında İstanbul’da doğdu. 2013 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. 2017 yılında ise Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi Uluslararası İlişkiler Bölümü’nü tamamladı. Ardından, 2017 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Aynı yıl TÜBİTAK Projesi’nde Proje Asistanı olarak görev aldı ve proje tamamlanana kadar çalıştı. Şu anda Mankiewicz Boyaları San. ve Tic. Ltd. Şti.’de çalışmaktadır.