

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ESCHERICHIA COLI* AKUPORİN-Z İÇEREN NANOFİLTRASYON
MEMBRAN ÜRETİMİNİN VE FİLTRASYON PARAMETRELERİN
OPTİMİZASYONU**

AYŞENUR ÖZTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ESCHERICHIA COLI* AKUPORİN-Z İÇEREN**
NANOFİLTRASYON MEMBRAN ÜRETİMİNİN VE
FİLTRASYON PARAMETRELERİN
OPTİMİZASYONU

AYŞENUR ÖZTÜRK
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

OPTIMIZING PRODUCTION OF *ESCHERICHIA COLI*
AKUAPORIN-Z CONTAINING NANOFILTRATION
MEMBRANE AND FILTRATION PARAMETERS

AYŞENUR ÖZTÜRK
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 06/01/2019 tarih ve 0/4 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 06/02/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ayşenur Öztürk'ün tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

:Doç. Dr. Pınar ERGENEKON

ÜYE

:Prof.Dr. Ayten Yazgan KARATAŞ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

ÖZET

Bu tez çalışmasında *Escherichia coli* (*E. coli*) akuaporin Z proteini kullanılarak biyomimetik bir desalinasyon membranı üretilmiştir. *E. coli* akuaporinZ geni daha önceki çalışmalarda pGEX-4T-2 saflaştırma vektörüne klonlanmıştır, bu tez çalışmasında akuaporin (GST-ECAqpZ) BL21 hücrelerinden Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) boncukları kullanılarak saflaştırılmıştır. Akuaporinler DOPC lipozomalrı içine film rehidrasyon yöntemiyle yerleştirilmiş ve durdurulmuş akışlı ışık saçılım spektrometresinde su geçirgenlikleri ölçülmüştür. Işık saçılım değerleri saflaştırılan akuaporinlerin fonksiyonel olduğunu göstermektedir. Ayrıca lipozomların içindeki akuaporin miktarı artırıldıkça su geçirgenliğinin arttığı görülmüştür. Lipozom içine yerleştirilen akuaporinler polisülfon membran yüzeyine ince film tabaka (TFC) yöntemi ile yerleştirilmiştir. Hazırlanan TFC konposit membranların su geçirme ve tuz reddetme kapasiteleri ölü uçlu filtrasyon hücresi kullanılarak ölçülmüştür. Akuaporin içeren biyomimetik membranların tuz reddetme kapasiteleri farklı akuaporin miktarı (0.5, 1 ve 2 mg/ml), farklı tuz konsantrasyonları (10, 100 ve 800 mM) ve iki farklı basınçta (5-10 bar) test edilmiştir. Tuz konsantrasyonu arttıkça membranların reddetme (% R) kapasitesi düşmesine karşın, akuaporin içeren membranların tuz reddetme hızlarının (saatte itilen tuz miktarı) kontrol membranına kıyasla oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Akuaporinlerin membranların su akısını artırdığı tespit edilmiştir. Deniz suyuna eşdeğer (800 mM) tuzlu su filtre edildiğinde *E. coli* AqpZ içeren membranın en yüksek tuz reddetme değeri 5 bar basınç için 1 mg/mL proteolipozom içeren membranla 47.2 ± 19.5 , 2 mg/mL proteolipozom içeren membranda ise 60.07 ± 22.1 g/m².sa olarak ölçülmüştür. Ayrıca, akuaporin içeren membranların glikoz, gliserol ve üreyi filtre etme kapasiteleri belirlenmiştir. Akuaporin içeren membranın glikoz reddetme kapasitesi kontrole kıyasla yüksek bulunmuştur, ancak üre ve gliserol filtrasyonu için uygun olmadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: AkuaporinZ, Biyomimetik membranlar, Desalinasyon, *Escherichia coli*.

SUMMARY

In this thesis, biomimetic membranes were produced by using aquaporin proteins obtained from *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria. *E.coli* AquaporinZ gene was previously cloned in pGEX-4T-2 purification vector. In this study, these recombinant aquaporins were purified from *E. coli* BL21 cells using Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) beads. Purified aquaporins were embedded in DOPC liposomes by film rehydration method and their water permeation capacities were measured using stop-flow light scattering spectrometry. According to the measurement results, it was observed that the light scattering increased as the aquaporin concentration increased in the liposomes. Aquaporins placed in liposomes were placed on polysulfone membrane surface by thin film layer (TFC) method. Water permeability and salt rejection capacity of prepared membranes were measured using a dead-end filtration cell. The salt rejection capacities of the aquaporin-containing membranes were tested with different aquaporin amounts (0,5, 1 and 2 mg/mL), different salt concentrations (10, 100 and 800 mM) and under two different pressures (5 and 10 bar). Results showed that as salt concentration increased, rejection (% R) capacities of membranes decreased, however, salt rejection rates increased. The highest salt rejection rate of *E. coli* AqpZ-containing membrane with 1 mg/mL and 2 mg/mL proteoliposome concentration was measured as $47,2 \pm 19,5$ and $60,07 \pm 22,1$ g/m².h, respectively, at 5 bar pressure with 800 mM saline. In addition, the capacity of aquaporin containing membranes to filter glucose, glycerol and urea was determined. While incorporation of GST tagged *E. coli* aquaporinZ to the membrane structure increased glucose rejection, it was not usable for urea and glycerol rejection.

Key Words: AquaporinZ, Biomimetic membranes, Dessalination, *Escherichia coli*.

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü bilimsel katkısıyla ufkumu genişleterek bana yol gösteren, tezimin oluşmasında ve tamamlanmasında yoğun katkılarıyla desteğini ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Melek ÖZKAN’a,

Tezin oluşmasında 115Z245 No’lu “Halofilik bakteri *Halomonas elongata* akuaporini kullanılarak biomimetik bir nanofiltrasyon membranı hazırlanması” başlıklı projeye destek veren ve bana Proje Asistanı olarak çalışma imkânı sağlayan TÜBİTAK’a,

Hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman yanımda olan ve desteğini hiç esirgemeyen annem Kadriye Öztürk, babam Ali Öztürk ve kardeşlerim Kübra Afra Öztürk ve Berat Öztürk’e

Yapılan bütün çalışmalarda bana destek olup benimle birlikte çalışan, her türlü desteği gösteren Ayşen YILDIZ’a, Hilal YILMAZ’a ve Arş. Gör. Esra MEŞE’ye teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. LİTERATÜR	3
2.1. Desalinasyon	3
2.1.1. Desalinasyon Nedir?	3
2.1.2. Tuzsuzlaştırma Prosesleri	4
2.1.3. Türkiye’de Desalinasyon	6
2.2. Membran Teknolojisi	8
2.2.1. Membran Tarihçesi	8
2.2.2. Membran Sistemleri	9
2.2.2.1. Membran Seçiciliği	12
2.2.3. Uygulama Alanları	13
2.2.3.1. Membranların Avantaj ve Dezavantajları	14
2.2.4. Membran Malzemeleri ve Özellikleri	15
2.2.4.1. Membran Malzemeleri	16
2.3. İnce Film Kompozit Membranları	19
2.4. Tuzsuzlaştırma Membran Teknolojisinde Gerçekleşen Son Gelişmeler	22
2.4.1. Tuzsuzlaştırma Membranlarını Sentezlemek İçin Yeni Materyaller ve Yöntemler	24

2.4.1.1. Akuaporin	24
2.4.1.2. Karbon Tabanlı Materyaller	26
2.4.2. Yeni Tuzsuzlaştırma Membranlarına Genel Bir Çerçeve	27
2.4.2.1. AQP Tabanlı Tuzsuzlaştırma Membranlarına Genel Bakış	28
2.4.2.1.1. AQP Tabanlı PRL Membranları	29
2.4.2.1.2. AQP Tabanlı TFN Membranları	30
2.5. Escherichia coli	34
2.5.1.E. coli AqpZ	35
2.5.1.1. Tez Kapsamında Kullanılacak Olan GST etiketli E.coli AqpZ Proteini	35
3. MATERYAL ve METOT	37
3.1. Akuaporin Proteinlerinin Üretimi ve Saflaştırılması	37
3.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi (SDS-PAGE) Analizi	38
3.3. Lipozom Hazırlama	39
3.3.1. Akuaporin Proteini İçeren Lipozomların Hazırlanması	40
3.3.2. Lipozomların Karakterizasyonu	40
3.3.3. Lipozomların Su Geçirgenliklerinin Tespiti	41
3.4. Biyomimetrik Membranların Hazırlanması	42
3.4.1. Akuaporin Keseciklerinin Sabitlendiği Membran Tabakanın Hazırlanması	42
3.5. Ölü Uçlu Filtrasyon Sistemi İle Membran Filtrasyon Parametrelerinin Belirlenmesi	44
3.5.1. Tuz Konsantrasyonunun Belirlenmesi	46
3.5.2. Glikoz ve Gliserol Konsantrasyonunun Belirlenmesi	46
3.5.3. Üre Konsantrasyonunun Belirlenmesi	46
4. BULGULAR	48
4.1. Akuaporin Proteinlerinin Hücre Zarından Saflaştırılması	48
4.2. GST-AqpZ'nin Aktivite Ölçümü	49
4.3. Akuaporin İçeren Membranların Su Geçirgenliği ve Tuz Reddetme Kapasitelerinin Belirlenmesi	51

4.4. Akuaporin İçeren Membranların Glikoz, Üre ve Gliserol Filtrasyon Kapasitelerinin Belirlenmesi	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	69
EKLER	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar

Kisaltmalar

A	: Membranın su geçirgenlik katsayısı
B	: Membranın çözünür madde geçirgenlik katsayısı
C _{inf}	: Giriş çözeltinin tuz yoğunluğu
C _{enf}	: Süzülen çözeltinin tuz yoğunluğu
LMH	: Litre/m ² .saat
P _f	: Su geçiş hızı
Ppm	: Parts per million
J _v	: Akı (L/m ² .sa)
J _{SR}	: Tuz reddetme hızı
K	: Membran geçirgenliği sabiti
X	: İtici kuvvet
βME	: β-Mercapto Ethanol
ΔP	: Basınç farkı
Δπ	: Osmatik basınç farkı
ABA	: Methacrylate end functionalized poly(2 methyloxazoline-b-dimethylsiloxane-b-2-methyloxazoline) PMOXA(1000)-b-PDMS(4000)-PMOXA(1000) triblock.
BL	: Boş lipozom içeren membran
DOPC	: 1,2-Dioleoil-sn-Glisero-3-Fosfokolin
DOTAP	: 1,2-Dioleoil-3-Trimetilamonyum Propan
IPTG	: İzopropil β-D-1-Tiogalaktopiranosid
OG	: Octyl β-D-Glucopyranoside
NaCl	: Sodyum Klorür
PAN:	: Poliakrilonitril
PEI:	: Polietilenimin
PSS	: Polisodyum 4-Stiren Sülfonat

MPD	: M- Fenilen-Diamin
TMC	: Trimesoyl Chloride
Arg-195	: Arginin
Asn	: Asparajin
AQP	: Akuaporin
AqpZ	: Akuaporin-Z
AnMBRs	: Anaerobik Membran Biyoreaktör
CNTs	: Karbon Nanotüpler
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EC	: <i>Escherichia coli</i>
ED	: Elektrodializ
GO	: Grafen Oksit
GST	: Glutation S Transferaz
LB	: Luria Broth
M	: Marker
MED	: Çok Etkili Damıtma
MF	: Mikrofiltrasyon
MSF	: Çok Basamaklı Ani Damıtma
NF	: Nanofiltrasyon
NPG	: Nanoporous Grafen
OSW	: Office of Saline Water
PA	: Poliamid
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDI	: Polydispersity Index
PRL	: Birincil Reddetme Katmanı
PS	: Phosphatidylserine
RO	: Ters Osmoz
Rpm	: Rounds per minute
SDS-	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi
PAGE	

SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
SWRO	:	Deniz Suyu Ters Ozmoz
TFC	:	İnce Film Kompozit
TFN	:	İnce Film Nanokompozit
UF	:	Ultrafiltrasyon
WCP	:	Water Channel Proteins

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Tuzsuzlaştırma kapasitesi en yüksek ülkeler.	3
2.2: Su veya tuzların ayırıştırma yöntemine göre tuzdan arındırma işlemlerinin akış tablosu.	5
2.3 Membrane-ayırma proseleri.	10
2.4: Destek tabakası ve aktif tabakadan oluşan bir membran kesiti.	17
2.5: İnce film kompozit membranların kesiti.	18
2.6: Mikro gözenekli yüzeyin üzerinde oluşturulan PA aktif tabaka ile ince film kompozit membranın şematik temsili.	19
2.7 (A) İnce film kompozit (TFC) membran ve ince film nanokompozit (TFN) membranın membran yapısının şematik diyagramı,(B) trimesoil klorür (TMC) ve m-Fenilendiamin (MPD) kullanılarak poliamidin ara yüzey polimerizasyonu.	23
2.8 AQP1 protein kanalından (kesit görünümü) su transferinin şematik yapı ve mekanizması.	25
2.9 AQP-tabanlı tuz giderme membranlarının şematik diyagramları.	29
2.10 AQP bazlı TFN membran (a) AQP tabanlı TFN membranlarının şematik diyagramı, (b) TFN membranlarının su taşıma mekanizmasının kavramsal modeli.	30
3.1 İnce Film Yöntemi İle Lipozom Yapımı.	39
3.2 Lipidlerin Oluşum Basamakları.	40
3.3 Durdurulmuş akışlı ışık saçılım Spektrometre cihazının çalışma mekanizması.	41
3.4 Hazırlanan MPD çözeltileri.	43
3.5 Kaplaması yapılan membranlar.	43
3.6 Ölü uçlu filtrasyon sistemi.	45
4.1 GST etiketli E. coli akuaporin tetramerinin (GST-EcAqpZ) SDS-PAGE jel görüntüsü M: Fermentas Prestained Protein MW Marker 1: GST-EcAqpZ tetramer.	48

4.2	0.85M NaCl çözeltisi içindeki 200 nm DOPC lipozomlarının normalize ışık saçılımı ölçüm sonuçları 0.85M NaCl 200 nm DOPC EcAqpZ.	49
4.3	Akuaporin (2 mg/mL) içeren membranların 5 ve 10 bar basınç uygulamasında su geçirgenlikleri ve tuz reddetme hızları.	55
4.4	Farklı akuaporin miktarlarına sahip membranların glikoz reddetme hızları.	57
4.5	Akuaporinli membranların glikoz, üre ve gliserol reddetme hızları (1 mg/mL proteolipozom yoğunluğunda).	58

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Türkiye'de 2015 yılı itibariyle deniz suyu arıtımı aktif kapasiteleri.	6
2.2: Türkiye için tahmini su arıtma talebi.	7
2.3: Ticarileşmiş membran işlemlerinin sınıflandırılması.	11
2.4: Yaygın kullanılan polimerik membran malzemelerin camsı geçiş sıcaklığı (T _g) ve erime sıcaklıkları (T _m).	16
2.5: İnce film kompozit ve selüloz membranların karşılaştırılması.	18
2.6: Lau ve ark.'nın çalışmalarından TFC membranı için monomerlerin güncellenmiş listesi.	20
2.7: AqpZ, CNT, NPG ve GO'nin malzeme özellikleri.	27
2.8: Yeni tuzdan arındırma membranları.	28
2.9 AQP-tabanlı birincil reddetme katmanı (PRL) membranlarıyla yapılan çalışmalar.	32
2.10 AQP-tabanlı İnce film nanokompozit (TFN) membranlarıyla yapılan çalışmalar.	33
4.1: 200 nm'lik DOPC lipozomlarında akuaporinlerin su geçirgenliği (P _f).	50
4.2: Proteolipozomlardaki akuaporin: lipid oranının su geçiş hızına etkisi.	50
4.3: 200 nm'lik DOPC lipozomlarında akuaporinlerin geçirme hızı (P _f).	50
4.4: Farklı oranlarda EcAqpZ içeren membranların farklı tuz yoğunluklarında tuz reddetme kapasiteleri (R), su geçirgenlikleri ve tuz reddetme hızları (5 bar basınçta).	52
4.5: Farklı oranlarda ve EcAqpZ içeren membranların farklı tuz yoğunluklarında tuz reddetme kapasiteleri (R), su geçirgenlikleri ve tuz reddetme hızları (10 bar basınçta).	54
4.6: Akuaporin içeren membranların glikoz reddetme hızları.	56
4.7: Akuaporin içeren membranların üre reddetme hızları.	57
4.8: Akuaporin içeren membranların gliserol reddetme hızları.	58

1. GİRİŞ

21.yüzyılda dünya nüfusunun artması, kentlselleşme ve sanayileşme güvenilir su kaynağı taleplerinin de artmasına neden olmuştur. Hızlı büyüme ile yakından bağlantılı olan hava kalitesindeki değişimlerin etkileri de su temini ve talebi arasındaki dengeyi daha da karmaşıklştırmıştır. Su kıtlığına sebep olan sorunların yaygın olması ve gelecek yıllarda önemli ölçüde artması öngörülmektedir. Ekonomik ve güvenli içme suyu sağlamak için benimsenen birçok strateji arasında atık su arıtımı ve tuzsuzlaştırma artan talebi karşılamak ve su kıtlığı sorunlarını hafifletmek için ümit verici bir çözüm olarak düşünölmektedir [1], [2].

Tuzsuzlaştırma ve atık su arıtma, su kaynaklarının tamamen tükenmesinin önüne geçmek için önemli bir fırsat olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle deniz suyundan, tuzlu sulardan, drenaj suyundan ve arıtılmış atık sulardan taze su üretimi, deniz ve kıyı bölgelerindeki su kıtlığını azaltmak için önemli bir çözüm olarak kabul edilmektedir. Membran teknolojisine dayanan tuzsuzlaştırma ve atık su arıtımı, temiz içme suyuna erişimin artırılması zorluğunun üstesinden gelmek için kapsamlı olarak araştırılan yaklaşımlardan biridir. Aslında, son zamanlardaki gelişmeler, su sorunlarını gidermek için ticari olarak temin edilebilen membranların ve membran sistemlerinin uygulanmasının potansiyel olarak güvenilirliğini göstermektedir [3], [4]. Ters ozmoz (RO) gibi basınçla çalışan membran teknolojileri, az yer kaplamasının yanı sıra içilebilir kalitede su elde etmek için ekonomik ve etkili çözümler sunduğu için uzun zamandır büyük bir ilgi görmektedir.

Mevcut olan membranlar arasında, tuzsuzlaştırma için ince film kompozit (TFC) membranların en etkili çözüm olduğı düşünölmektedir [5]. Bu membranlar, tipik asimetrik membranlara kıyasla daha az enerji tüketir ve seçiciliğı ve üretkenliğı yükseltir. Gözenekli bir yapı üzerinde oluşan çok ince bir poliamid (PA) aktif katmanı, TFC membranının ana özelliğidir [6]. Çoğunlukla kullanılan, m-fenilen diamin (MPD) ve trimesoil klorür (TMC), PA tabakasının oluşumu için iki ana aktif monomerdir [7].

TFC membranların üretkenliğini arttırmak amacıyla değişik modifikasyonlar uygulanabilmektedir. Bunlardan biri membran yüzeyine akuaporin yerleştirilmesidir. Akuaporinler, canlılarda su moleküllerinin geçişine izin veren ve diğer tüm çözünen

maddeleri reddeden hücre zarı proteinleridir. Akuaporinlerin farklı hücre membranlarında keşfedilmesi üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır ve canlı organizmaların biyolojik membranlarında yüksek su hareket kapasitesinin akuaporin kanal proteinleri tarafından sağlandığı anlaşılmıştır [8]. Ayırma performansı ile ilgili olarak, akuaporin esaslı TFC biyomimetik membranlarıyla, NaCl reddedilmesinde ticari RO membranlara kıyasla daha yüksek su geçirgenliği elde edebileceği bildirilmiştir [9].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında *E. coli* akuaporini kullanılarak biyomimetik bir desalinasyon membranı geliştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında daha önceki çalışmalarda klonlanmış olan *E. coli* akuaporini üretilmiş, saflaştırılmış ve ince film kompozit membran üretimi amacıyla kullanılmıştır. Üretilen membranın tuz reddetme kapasitesi farklı akuaporin konsantrasyonlarında ve farklı basınçlarda denenmiştir. Ayrıca üretilen bu biyomimetik membranın glikoz, üre ve gliserol reddetme kapasitesi de incelenmiştir.

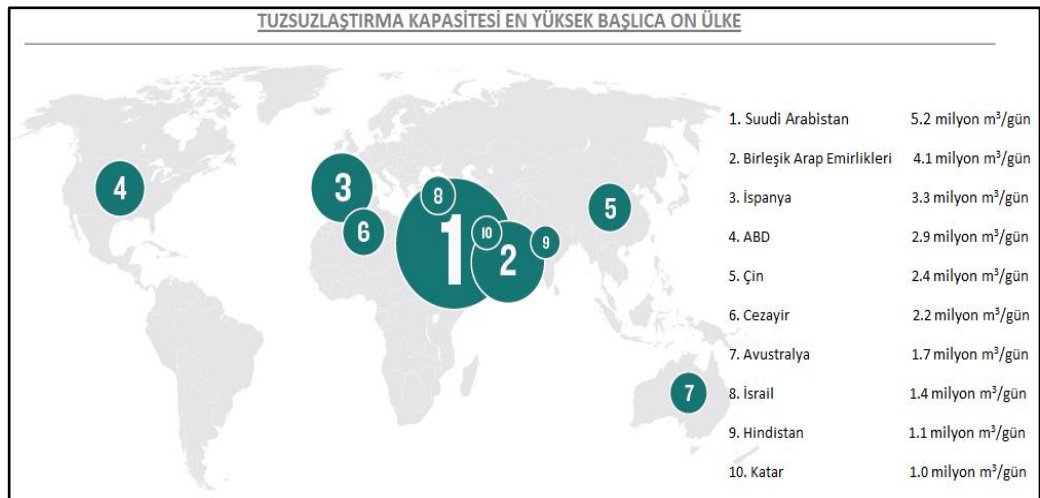
2. LİTERATÜR

2.1. Desalinasyon

2.1.1. Desalinasyon Nedir?

Desalinasyon; içme, sanayi, ilaç, belediye veya evsel su gibi herhangi bir kullanım için düşük tuz içerikli su elde edilmesi amacıyla deniz suyu gibi tuz içeriği yüksek olan sulardaki tuz yoğunluğunu düşürmek için kullanılan fiziksel bir işlemdir. Desalinasyon işlemine tuzsuzlaştırma da denilmektedir [10].

“Dünya nüfusunun yaklaşık % 25'i ciddi boyutlarda içme suyu sıkıntısı çekmektedir. Aynı zamanda bu bölgelerde kullanılan içme suları sağlıklı şartlardan yoksundur. Dünya üzerindeki su potansiyelinin yalnızca % 0.5'i içilebilecek nitelikte olup, % 97'si deniz suyu, % 2.5 'i yeraltında bulunan tuzlu sulardır. Bu tuzlu sular içilebilecek nitelikte suya dönüştürülürse su temini açısından sınırsız bir kaynak elde edileceği açıktır [10]. Şekil 2.1'de ki harita, 2014 yılında toplam kurulu tuzsuzlaştırma tesisi kapasitesine göre ilk sıralarda yer alan 10 ülkeyi göstermektedir. Suudi Arabistan, günlük olarak yaklaşık 5.2 milyon metreküp su üretimi ile başı çekmektedir [11]. Türkiye ise günde yaklaşık 290.000 m³ kapasite ile bu ülkelerin gerisinde kalmaktadır [15].



Şekil 2.1: Tuzsuzlaştırma kapasitesi en yüksek ülkeler.

2.1.2. Tuzsuzlaştırma Prosesleri

Tuzsuzlaştırma teknolojisi ve yöntemleri, 1952'den 1972'ye kadar ABD İçişleri Bakanlığı'nın Tuzlu Su Ofisi'nin (Office of Saline Water (OSW)) faaliyetleri sayesinde gelişmiştir. Bu yıllar boyunca, Ar-Ge'deki yoğun OSW faaliyetleri ve beş tesisinin inşası, büyük endüstriyel uygulamaların başlamasını sağlamıştır. 1972'den sonra ise endüstri Ar-Ge ve teknik uygulamaları üstlenmiştir [10].

Birçok desalinasyon yöntemi yoğun olarak incelenmiştir ancak bunlardan çok azı geniş endüstriyel uygulama alanı bulmuştur. Bu yöntemler termal ve termal olmayan süreçler olmak üzere iki genel gruba ayrılır. Temel desalinasyon işlemleri uygulanan enerji türüne göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

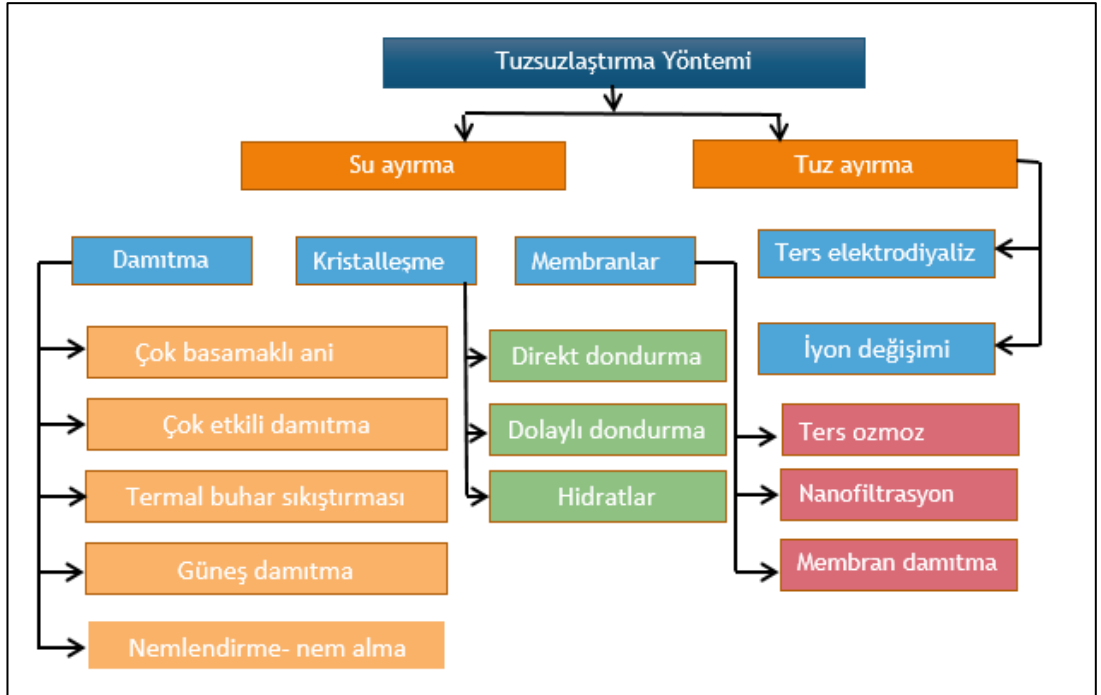
- Termal kaynaklı tuz giderme yöntemleri (damıtma süreçleri)
 - Güneş damıtma
 - Nemlendirme - nem alma
 - Çoklu nemlendirme- çoklu nem alma
 - Membran damıtma
 - Çok etkili damıtma
 - Çok basamaklı ani damıtma
 - Termal buhar sıkıştırması

Tümü, kullanılan enerji türünden bağımsız olarak, farklı çalışma ve ekipman tekniklerini uygulayan damıtma yöntemleridir. Güneş damıtma, membran damıtma ve nemlendirme-nem alma yöntemleri küçük ölçekli prosedürler olup ticarileşmemiştir, bu nedenle henüz geleneksel tuzsuzlaştırma yöntemi olarak kabul görmemişlerdir.

- Elektrikle çalışan tuz giderme yöntemleri
 - Ters osmoz
 - Elektrodializ, ters elektrodializ
 - Mekanik buhar sıkıştırması [10].

Dünya çapında 15.000'den fazla geleneksel tuzsuzlaştırma ünitesi mevcut olup, günde ~70 milyon m³ tatlı su üretmektedir. Bu tuzsuzlaştırılmış suyun % 50'si Orta Doğu ülkelerinde üretilmektedir. Bu birimlerin % 60'ı, enerji tüketimi ~5 kWh m⁻³ olan RO tesisleridir ve yaklaşık % 27'si 25 kWh m⁻³ enerji tüketen çok kademeli damıtma üniteleridir. Çok etkili damıtma tesisleri dünya çapında tuzsuzlaştırılma yoluyla su üretiminin yaklaşık % 8'ine katkıda bulunur ve termal desalinasyon yöntemlerinin % 15'ini oluşturur [12].

Mevcut geleneksel tuzsuzlaştırma yöntemlerinin suyun ve tuzun ayrılmasına göre sınıflandırılması Şekil 2.2'de gösterilmiştir [10]. Damıtma, kristalleşme ve membran teknolojileri suyun ayrılmasında kullanılan metodlar olarak kabul görürken, ters elektrodiyaliz ve iyon değişimi tuz ayırma metodu olarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 2.2: Su veya tuzların ayrıştırma yöntemine göre tuzsuzlaştırma işlemlerinin akış tablosu.

2.1.3. Türkiye'de Desalinasyon

Türkiye'nin etrafını çevreleyen Karadeniz, Akdeniz ve Ege Denizi desalinasyonla içme suyu eldesi için büyük bir potansiyele sahiptir. Buna göre, su depolama yatırımları, mevcut su kaynaklarını maksimum verimle daha iyi kullanmak için hükümet tarafından arttırılmakta ve desteklenmektedir [14].

Deniz suyu ters ozmoz (SWRO) arıtma tesisleri, maliyetlerinin düşük olması nedeniyle kullanılmaktadır. Şu anda kullanılan çok basamaklı ani damıtma (MSF) desalinasyon ve çok etkili damıtma (MED) kapasitesi de kullanım ömürlerine göre aşamalı olarak kullanımdan kaldırılmaktadır [14].

Türkiye'de şu anda üç çeşit tuzsuzlaştırma teknolojisi kullanılmaktadır. Bunlar, termal teknolojiler arasında sayılan çok basamaklı ani damıtma (MSF) ve çok etkili damıtma (MED), ve deniz suyu ters ozmoz (SWRO) olarak bilinen membran teknolojisi. Mevcut desalinasyon kapasitesi, SWRO tarafından yönetilmektedir ve kurulu kapasitenin sadece % 10'u MED'dir ve kurulu kapasitenin % 1'inden azı MSF'dir. SWRO desalinasyon teknolojisi, 2015 yılından sonra enerji verimliliği avantajları ve düşük maliyeti nedeniyle tercih edilen tek teknolojidir [15]. Tablo 2.1, arıtma kapasitelerinin bölgesel dağılımını göstermektedir.

Tablo 2.1: Türkiye'de 2015 yılı itibarıyla deniz suyu arıtımı aktif kapasiteleri.

Bölgeler	Aktif	Toplam	Kapasite	Aktif	Toplam
	(m ³ /gün)	(m ³ /gün)		Kapasite	(m ³ /gün)
	MSF	SWRO	MED	Bölgelere göre toplam kapasite	
Akdeniz	0	43.000	5.250	48.250	
Marmara	1.000	116.782	3.606	121.388	
Ege	0	22.706	0	22.706	
Kara Deniz	0	92.072	0	92.072	
İç Anadolu	0	28.190	0	28.190	
Güneydoğu Anadolu	0	0	0	0	
Doğu Anadolu	0	0	0	0	
Toplam	1.000	302.750	8.856	289.900	

Yapılan çalışmada 2015-2050 yılları arasındaki zaman dilimi için Türkiye’de desalinasyon için gereken su talebi bölgelere bölünmüş olarak Tablo 2.2 de gösterilmektedir [15].

Tablo 2.2: Türkiye için tahmini su arıtma talebi.

Bölgeler	milyon m ³ / day							
	2015	2020	2025	2030	2035	2040	2045	2050
Akdeniz	1.75	2.48	3.38	4.37	5.37	6.36	7.4	8.42
Marmara	4.16	5.9	8.06	10.42	12.79	15.15	17.62	20.07
Ege	1.77	2.51	3.42	4.42	5.43	6.43	7.48	8.52
Kara Deniz	1.34	1.9	2.6	3.35	4.11	4.88	5.67	6.46
İç Anadolu	2.14	3.04	4.15	5.36	6.58	7.79	9.06	10.32
Günaydoğu Anadolu	1.45	2.06	2.82	6.64	4.47	5.3	6.16	7.01
Doğu Anadolu	1.04	1.48	2.02	2.62	3.21	3.8	4.43	5.04
Toplam tuzsuzlaştırma talebi	13.65	19.37	26.45	37.18	41.96	49.71	57.82	65.84
Toplam su talebi	129.6	146.4	158.4	175.2	184.8	199.2	216	230.4

Tuzsuzlaştırma işlemi son yıllarda maliyeti düşmesine rağmen hala pahalı bir işlemdir. Desalinasyon maliyeti aynı miktarda doğal suyun kısa mesafeden taşınmasına kıyasla daha yüksektir. Bununla birlikte, daha uzak mesafelerden suyun taşınması veya pompalanması, alanın uzaklığına ve morfolojik yapısına bağlı olarak, tuzsuzlaştırma sistemleri kadar pahalı olabilir. Doğal su pompalama maliyeti daha çok tesisatın sermaye maliyetine bağlıdır. Çalışmanın başlangıcında, tüketim gerçek kapasiteden daha düşük olabilir ve nispeten yüksek maliyete sahip olabilir. Tüketim genellikle hızla artar ve su kaynağı neredeyse bitene kadar maliyet düşer. Daha sonra yeniden başlamak için başka bir kaynak bulunmalıdır. Bir tuz arıtma tesisinde ise talebe göre kapasite arttırılabilir. Ayrıca, bol miktarda tuzlu su kaynağına sahip olup temiz su kaynağı problemi yaşayan ülkeler için desalinasyon en uygun çözümdür.

2.2. Membran Teknolojisi

2.2.1. Membran Tarihçesi

18. yüzyılın sonlarında ozmoz kavramı anlaşılmaya başlandığından itibaren membranlar günümüz su ve atık su arıtımına yardımcı bir teknoloji olarak öne çıkmaya başlamıştır. 1960'lı yıllardan sonra laboratuvar ölçekli çalışmalardan büyük ölçekli sistemlere geçiş başlamıştır. 1960 ve 1970'li yıllarda düşük ücretli membran sistemlerinin oluşturulmasıyla membranlar endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [16].

Ultrafiltrasyon (UF) 1969'da Smith ve arkadaşları tarafından aktif çamur sistemlerinde çöktürme işlemine alternatif olarak ilk kez sunulmuştur. 1970'de Japon piyasasına bu teknoloji ilk kez girmiştir. Tam ölçekli ticari aerobik membran biyoreaktör işlemi 1970'lerin sonunda ilk kez Kuzey Amerika'da uygulanmıştır ve daha sonra 1980'lerin başında Japonya'da uygulanmaya başlamıştır. 1993'de sıhhi uygulamalarda kullanım için Avrupa'da harici membran biyoreaktörler raporlanmıştır [17].

Ters osmoz (RO) çalışmaları ilk olarak 1920'lerde yapılmaya başlanmıştır. 1945'lere kadar mikro gözenekli membranlar öncelikli olarak mikroorganizma ve parçacık uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. II. Dünya Savaşı sonrasında, Juda ve McRae iyon seçici membranları kullanarak elektrodializde (ED) kullanılmıştır. Daha sonra ED sistemler ticari olarak tuzlu sudan tuz gideriminde kullanılmıştır. 1950'li yıllarda polimer ve çok ince selüloz asetat malzemeden yapılan membranlar keşfedilmiştir. 1960'lı yıllarda ise ilk olarak tübüler RO membranları daha sonrasında tübüler membranlardan daha etkili spiral sargılı membran modülü geliştirilmiştir. Bu süreçte aynı zamanda bilim adamları yeni membran materyali ve modülleri dizayn etmişlerdir. 1970'li yıllarda ise hollow fiber ve ince film kompozit membran modülleri geliştirilmiştir [18].

Daha sonra 1980'li yıllarda organik membranların yanı sıra inorganik membran kullanımı ile nanofiltrasyon membranları da üretilmeye başlanmıştır [5]. 1980'lerden itibaren ultrafiltrasyon, mikrofiltrasyon (MF), ters osmoz ve elektrodializ

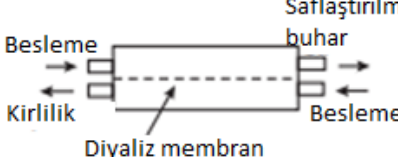
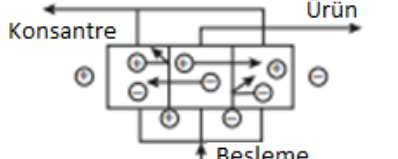
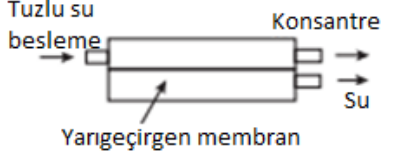
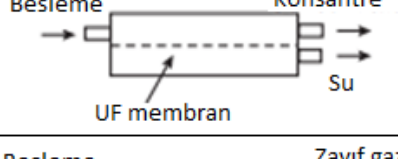
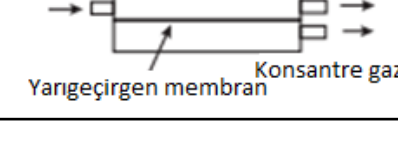
proseslerinin tümü dünya çapında yaygın olarak büyük tesislerde kurulmaya başlamıştır [18].

Yıldız ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada membran teknolojilerinin atıksu arıtımındaki yeri detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir [19]. Membran teknolojisinin ve uygulamalarının ilerlemesi sayesinde mikrofiltrasyon veya ultrafiltrasyon üçüncül arıtma basamağının yerini alabilir. Membran teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde mikrofiltrasyon veya ultrafiltrasyon biyolojik arıtma süreçlerinde, katı/sıvı ayırma işleminde kullanılmaktadır ve çöktürme aşamasına ayrıca ihtiyaç kalmamaktadır [20]. Membran prosesleri maliyet ve arıtma etkisi bakımından hızlı bir şekilde su ve atık su endüstrisinde kendini kabul ettirmiştir. Günümüzde hızla gelişmekte olan polimer endüstrisi membran teknolojilerini çok daha rekabetçi hale getirmektedir [21]. Son yıllarda polimer ve dolayısıyla membran teknolojisindeki hızlı gelişmeler ve üretim maliyetinin azaltılması sebebiyle gerek içme suyu gerekse de atık su arıtma alanlarında membran prosesleri (özellikle mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon) konvansiyonel sistemlerle maliyet açısından rekabet edebilir hale gelmiş ve geniş çapta uygulanmaya başlanmıştır [22]. Aerobik süreçlerde uygulanan membranlar son yıllarda anaerobik proseslerde de kullanılmaya başlanmıştır [20]. Yüksek askıda katı madde içeren atık suların arıtımında batık veya harici anaerobik süreçle birleştirilen anaerobik membran biyoreaktör (AnMBRs) uygulaması, mezbaha atık suları, birincil ve ikincil çamurlar, sentetik madde olarak selüloz, hayvan gübresi gibi farklı maddeler kullanılarak çalışılmaktadır [20].

2.2.2. Membran Sistemleri

Bir membran, iki homojen faz arasında bir seçici bariyer olarak tanımlanır. Membran ayırma işlemlerinin şematik diyagramları Şekil 2.3'de gösterilmiştir. Membran prosesleri, sürekli ve kararlı proseslerdir. Membran prosesi besleme (feed) solüsyon, ürün (permeate) ve membranın ittiği çözünür maddenin yoğunlaştığı konsantre (retantate) fraksiyonlarını içerir. Membranlar bazı bileşenlerin geçişini seçici olarak sağlayan, ancak diğerlerine izin vermeyen ve bazı bileşenlerin diğerlerine göre daha hızlı geçmesine izin veren yarı geçirgen bariyerlerdir (aşağıdaki

Şekil 2.3’de membran kesikli veya düz çizgi halinde gösterilmiştir). Örneğin, ters ozmoz durumunda, membran su geçişine izin verir, ancak tuz geçişine izin vermez. Besleme tarafında konsantre tuzlu solüsyon olmasına rağmen membran iyonların ve tuzların neredeyse tamamını reddeder ve membranın diğer tarafında iyonsuz ürün elde edilmesi hedeflenir. Böylece, en geçirgen bileşen (su) ürün akımında zenginleşirken en az geçirgen bileşen (tuz) konsantre akısında zenginleşir [24].

Proses	Ayırma kavramı	Geçen malzemeler	İtici güç
Mikrofiltrasyon		Su ve çözünmüş türler	Basınç farkı, 10 psi
Diyaliz		İyon ve düşük moleküler ağır organikler	Konsantrasyon farkı
Elektrodiyaliz		İyonlar	Voltaj, 1-2 V/hücre çifti
Ters ozmoz		Su	Basınç farkı, 100-800 psi
Ultrafiltrasyon		Su ve tuzlar	Basınç farkı, 10-100 psi
Gaz ayırımı		Gaz ve buhar	Basınç farkı, 1-100 atm

Şekil 2.3: Membran ayırma proseleri.

Membran prosesi ve bu proses için tasarlanan membranın yapısı, besleme sıvısı ve çıkan ürün ile ilgili gereksinimler farklılık gösterdiği için her akışkan proses için uygun olabilecek tek bir membran prosesi yoktur. Farklı membran prosesleri ve özellikleri Tablo 2.4 ve Şekil 2.3’te gösterilmiştir. Aynı membran işlemi için bile

performansı besleme sıvısına bağlı olarak değişir. Örneğin, aynı akış hızı ve basınç altında bir su kaynağını sterilize etmek veya bir meyve püresi gibi viskoz bir sıvıyı konsantre etmek için bir UF membranı kullanıldığında, membran yüzeyindeki biriken itilen çözünür madde konsantrasyonuna bağlı olarak süzüntü akışı değişiklik gösterecektir; meyve suyu konsantrasyonunda % 70-80 daha düşük olacaktır. Bu nedenle, membranın yapısal özellikleri ve belirli bir uygulamadaki performansı farklılıklar gösterebilir [24].

Tablo 2.3: Ticarileşmiş membran işlemlerinin sınıflandırılması.

Proses	Gözenek büyüklüğü	İtici güç	Taşıma yöntemi
Mikrofiltrasyon	0.05 -10 μm	Basınç, 1-2 bar	Elekten geçirme
Ultrafiltrasyon	0.001-0.05 μm	Basınç, 2-5 bar	Elekten geçirme
Nanofiltrasyon	<2nm	Basınç, 5-15 bar	Dışında bırakma
Ters ozmoz	~6nm	Basınç, 15-100 bar	Ayrıcalıklı ayırma
Gaz ayırma	Gözeneksiz	Basınç, 15-100 bar	Çözeltili-difüzyon
Pervaporasyon	Gözeneksiz	Kısmi basınç farkı	Çözeltili-difüzyon
Diyaliz	10-30 Å	Konsantrasyon farkı	Elekten geçirme-dağılıma gücü farkı
Elektrodiyaliz	<200 Da	Elektriksel potansiyel	İyon göçü
Elektrikle kaplama	<200 Da	Elektriksel potansiyel	İyon göçü
Membran kontaktörü	Gözenekli, hidrofobik	Vakum	Elekten geçirme

İtici kuvvetin derecesi, membranda oluşan gradient potansiyeli tarafından belirlenir. Membran, besleme çözeltisi ve ürün arasında kütle transferini kontrol eder. Dış kuvvet uygulanmazsa, potansiyel fark sıfır olduğunda sistem dengeye ulaşacaktır. Membran prosesleri kinetik süreçler olduğundan ve damıtma, buharlaşma ve kristalleşme denge süreçleri olmadığı için, reddetme kuvveti değişmediği zaman, kararlı koşullar sağlandığında membran akışı sabit olacaktır [24].

Bir membranın kütle transferi, Fick's, Hagen-Poiseuille ve Ohm yasaları dahil olmak üzere birçok yarı-matematiksel model tarafından tanımlanmıştır. Basınçla çalışan membran-ayırma işlemleri için (RO, NF, UF, MF) taşınma ilişkisi eşitlik 2.1 de gösterilmektedir :

$$J = K \cdot \frac{\Delta P}{t} \quad (2.1)$$

Burada J trans-membran akısıdır (mol/m².s), K membran geçirgenliği sabiti (mol/m².s.Pa), ΔP membran genelinde basınç farkı (Pa) ve t (m) membran kalınlığıdır. Membran boyunca osmotik basınç farkı $\Delta\pi$ olduğunda itici kuvvet $\Delta P - \Delta\pi$ 'dir [24].

Akıya ilişkin bir membran işleminin özelliği, aşağıda tanımlanan eşitlik 2.2 ile hesaplanan ürün kazanımına göre belirlenir. Sıvı ayırmalarda, özellikle RO ve NF'da, temel performans göstergelerinden biridir:

$$\% \text{ ürün kazanımı} = \frac{\text{ürün akısı}}{\text{besleme akısı}} \times 100 \quad (2.2)$$

2.2.2.1. Membran seçiciliği

Membran ayırma prosesi, membran malzemesinin kimyasal ve fiziksel özellikleri tarafından yönetilir. Ayırma işlemi, ayrılacak maddelerin boyutu, şekli, kimyasal özellikleri veya elektrik yükü farklılıkları nedeniyle gerçekleşir. Reddetme katsayısı (R) eşitlik 2.3 bir membran işleminin ayırma yeteneğinin güvenilir bir göstergesidir:

$$\begin{aligned} \% \text{reddetme, } R \\ = \frac{\text{Besleme çözeltisinin konsantrasyonu} - \text{ürün çözeltisinin konsantrasyonu}}{\text{Besleme çözeltisinin konsantrasyonu}} \times 100 \end{aligned} \quad (2.3)$$

Membranın performansı, membran seçiciliği ve membran verimliliği arasındaki dengedir. Membran seçiciliği, α ($= A / B$), membrandan süzülen bileşenlerin birbirine oranı ile tanımlanır. A ($L/m^2.sa.bar$) membranın su geçirgenlik katsayısı ve B ($L/m^2.sa$) membranın çözünür madde geçirgenlik katsayısıdır. J ($L/m^2.sa$) akıdır, ΔP uygulanan basınçtır (bar) ve $\Delta\pi$ membrandaki ozmotik basınç farkıdır (bar). Akının fazla olması su geçirgenliği değerini yükseltirken çözünür madde geçirgenliğinin düşmesine neden olur. A ve B 'ye ilişkin denklemler eşitlik 2.4'de gösterilmiştir[24].

$$A = \frac{J}{\Delta P - \Delta\pi} \quad , \quad B = \left(\frac{1}{R} - 1 \right) \times J \quad (2.4)$$

2.2.3. Uygulama Alanları

Membranların temel kullanım alanları endüstriyel gazların ayrılması, su ve atık suların arıtılmasının yanı sıra, sıvı çözeltilerden, havadan ve endüstriyel baca gazlarından partikül maddelerin ayrılması gibi diğer önemli birçok uygulamada kullanılmaktadır. Ayrıca elektrokimyasal proseslerde iyon ayırma, kan ve idrarın diyalizi, membran bazlı sensörler, tedavi edici ilaçların kontrollü salgılanması gibi birçok işlemde de kullanım alanı bulmaktadır. Membranların diğer önemli uygulama alanlarının aşağıdaki örnekler verilebilir;

- Deniz suyundan içme ve kullanma suyu elde edilmesi,
- Tuzlu ve acı sulardan tuz ve metal giderimi,
- Deniz suyunun arıtılmasında ön arıtma işlemlerinde,
- Bakteri ayırma ve giderilmesinde,
- Meyve suyu ve alkollü içeceklerin berraklaştırılması ve alkollü içeceklerde dealkolizasyon işlemlerinde,
- Gaz ayırma işlemleri,
- Biyogazların üretimi ve ayrılması,
- Su, atık su ve sıvı çözeltilerden değerli metallerin geri kazanılması, gibi geniş uygulama alanlarına sahiptirler.

2.2.3.1. Membranların Avantaj ve Dezavantajları

Su arıtımında mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon ve ters ozmos sistemleri içeren membran prosesleri kullanılabilir. Membran proseslerin çok sayıda avantajı sıralanabilir. Örneğin ayırma ihtiyacı duyulan çok sayıda işlem membran prosesleriyle karşılanabilir. Membran prosesler ayırma işleminde genel olarak bir faz değişimine ihtiyaç duymazlar. Bunun bir sonucu olarak uygulanan sürücü kuvvet enerjileri azaltılabilir. Membran proseslerin işletme kontrolleri karmaşık değildir. Diğer birçok prosesle kıyaslandıklarında yardımcı ekipman ihtiyaçları azdır. Membranlar ayrılması istenen bileşenler için son derece yük seçiciliğe sahip özelliklerde üretilirler. Genelde, bu seçicilik derecesi yüksektir.

- Membranlar çok sayıda polimer ve inorganik maddeden üretilirler. Bu durum, geniş bir aralıkta bileşenlerin ayrılmasına imkân sunabilir.
- Kirlenici yapı ve kimyası üzerinde etki yapmaması,
- Güvenilir ve oldukça iyi düzeyde çıkış suyu kalitesi sağlamaları,
- Kimyasal katkı ihtiyacının olmaması (ilave kimyasallara ihtiyaç duymaması) gerekmektedir.

Bu avantajlarının yanı sıra membran teknolojisinin daha yaygın kullanımını sınırlayan dezavantajları da bulunmaktadır. Membran üretim ve pazarlama maliyetlerinin yüksek olması, seçiciliklerinin sınırlı olması nedeniyle her bileşen için kullanılamamaları, tek aşamada işletimin zor olması, genellikle iki veya üç aşamalı prosesler olmaları, çözelti ve membran uyumsuzluk problemi nedeniyle membran yapısının bozulabilmesi, polimerik membranların yapılarının ısıya dayanıklı olmaması, düşük akı nedeniyle daha fazla modüle ihtiyaç duyulması dezavantajlarındandır.

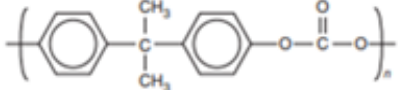
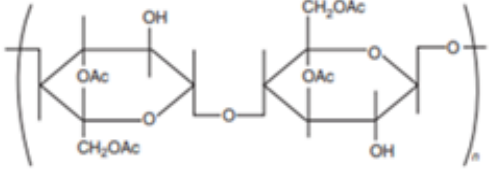
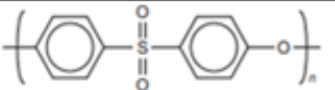
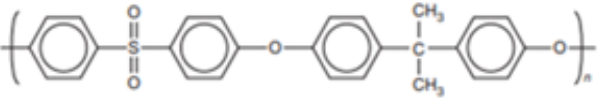
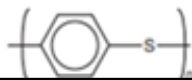
- Membran proseslerde besleme akı ve konsantrasyonlarına bağılı olarak kısa sürede kirlenebilir ve gözenekleri tıkanabilir. Membranların kirlenmesi ve gözeneklerin tıkanması akının azalmasına sebep olur.

Ayrıca membranların kısa süreli değiştirilmesi veya temizlenmesi gerekliliğı maliyeti artırır [25].

2.2.4. Membran Malzemeleri ve Özellikleri

Sentetik membranlar çok sayıda materyalden üretilebilmektedir. Bununla birlikte, selüloz asetat ve türevleri haricindeki materyaller, basınçla çalışan membran işlemleri için uygun değildir. Membranların yüksek geçirgenliğı ve yüksek seçicilikleri mekanik stabilite ile birleştirilmelidir. Tercihen sıvı ayırmaları için, membran hem hidrofilik hem de hidrofobik özelliklere sahip olmalıdır. Polimer (veya diğer materyaller) işleme gerekliliklerine, kirlenme eğilimine ve ayrıca membranın termal ve kimyasal stabilitesine göre seçilir. Membranlar için kullanılan yaygın polimerlerin bir listesi Tablo 2.4 verilmiştir.

Tablo 2.4: Yaygın kullanılan polimerik membran malzemelerin camısı geçiş sıcaklığı (T_g) ve erime sıcaklıkları (T_m).

Polimer	Yapısı	T _g (°C)	T _m (°C)
Polietilen	$\text{-(CH}_2\text{)-}_n$	-60 / -90	137-143
Polivinil florür	$\text{-(CH}_2\text{CF}_2\text{)-}_n$	-40	160-185
Polipropilen	$\text{-(CH}_2\text{CH(CH}_3\text{))}_n$	-10	167-170
Polikarbonat		150-155	240
Teflon	$\text{-(CF}_2\text{)-}_n$	-113	327
Sellüloz asetat		69	230
Polieter sülfon		225	NA
Polisülfon		190	NA
Polivinil alkol	$\text{-(CH}_2\text{CH(OH))}_n$	65-85	228-256
Poliakrilonitril	$\text{-(CH}_2\text{CH(CN))}_n$	80-104	319
Polifenilin sülfür		85	285

2.2.4.1. Membran Malzemeleri

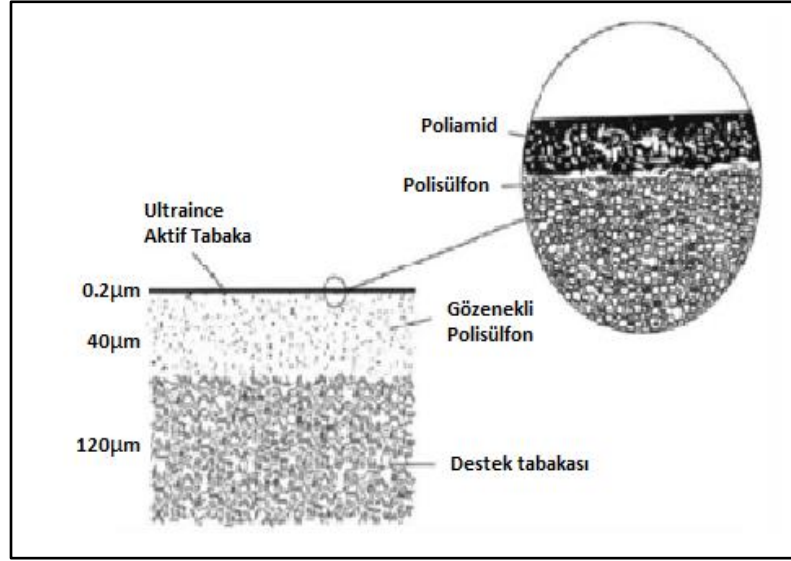
Membranlar, genellikle asimetrik (iki katmanlı) ve kompozit (üç katmanlı) yapıdadırlar. Ters osmoz membran malzemesi olarak en yaygın kullanılanları, selüloz asetat ve aromatik poliamid membranlardır. Ters osmoz işleminde, su arıtımı için genellikle Şekil 2.4 ve 2.5'te gösterilen ince film kompozit membranlar (TFC) kullanılmaktadır. İnce film kompozit membranlar genellikle üç tabaka içerirler. Bunlar, ince yoğun üst aktif tabaka (50–200 nm kalınlıkta), poroz destek tabakası (tipik olarak 50–150 µm) ve mekanik dayanıklılık için dokunmamış kumaş tabakasıdır

(100–500 μm). Esas giderme yüzeydeki aktif tabakada gerçekleşmektedir. Boşluklu destek tabakası ise özellikle deniz suyunda uygulanan 50-60 barlık çok yüksek basınçlara karşı aktif tabakaya destek olmaktadır.

Kompozit membranlar, genellikle kullanılan polisülfan mikroporoz malzeme üzerine arayüzey polimerizasyonu ile bir başka polimerin kaplanması ile elde edilir. Yüzeyde 250-20000A kalınlığında çok ince bir yüzey tabakası elde edilir. Yüzeydeki ince kaplama için çok değişik polimerler kullanılır. En yaygın kullanılanları, aromatik poliamidlerdir. Bunlar, arilalkol poliamid ve poliüre'dir. İlk üretilen poliamid membranlar için poliamid malzemesi kullanılmıştır. Bu membran malzemesi, oksidasyona karşı çok hassastır ve uzun dönemde performansı etkilenmektedir. Kompozitler ayrıca, tam aromatik çarpaz bağlarla bağlanmış poliamid malzemelerden de yapılabilir. Nanofiltrasyon membranlarında, üst tabaka olarak modifiye edilmiş poliamid ve piperazinamid malzemeleri de kullanılabilir [28].



Şekil 2.4: Destek tabakası ve aktif tabakadan oluşan bir membran kesiti.



Şekil 2.5: İnce film kompozit membranların kesiti.

Aromatik poliamid membranlar, selüloz membranlara göre daha geniş pH dayanımlara sahiptir. Hiç hidrolize olmadan, 2-12 pH aralığını tolere edebilirler. Biyolojik etkilerden etkilenmezler. Bununla birlikte, oksidasyona karşı dirençlerinin az olması, membran yüzeyinin zamanla zarar görmesine sebep olabilir. Bundan dolayı, poliamid membranlara girmeden önce klorlu ham suların kloru alınmalıdır. Tablo 2.5’de selüloz asetat ve kompozit membranların birbirlerine göre olan üstünlük ve mahsurları verilmiştir [26].

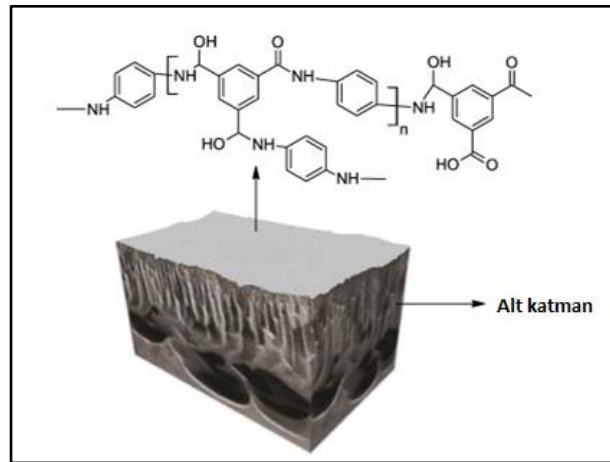
Tablo 2.5: İnce film kompozit ve selüloz membranların karşılaştırılması

Parametre	İnce film kompozit membranlar	Selüloz asetat membranlar
Tuz giderimi , %	Yüksek (> %99,5)	Düşük (maks. %95)
Basınç	Düşük	Yüksek
Yüzey yükü	Daha fazla negatif	Daha az negative
Klora olan tolerans	Zayıf	İyi
Yıkama sıklığı	Çoz	Az
Organik giderimi	Yüksek	Düşük
Biyolojik tıkanma	Daha çok hassas	Daha az hassas
Biyolojik bozunma	Yok	Yüksek
pH toleransı	2-12	4-8

2.3. İnce Film Kompozit Membranları

Hâlihazırda kullanılan mevcut membranlar arasında, TFC membranları, tuzsuzlaştıma işlemi için en etkili membran sistemleri olarak kabul edilmektedir. Bu membranlar, tipik asimetrik membranlara kıyasla daha az enerji tüketimi ile hem seçiciliği hem de üretkenliği arttırır. Gözenekli bir yüzey üzerinde oluşturulan çok ince bir poliamid (PA) aktif tabaka, TFC membranının ana özelliğidir. İnce film kalınlığı <0.5 nm ile dokular arası boşluk büyüklüğü <0.2 μm 'dir [29]. 1963 yılında Loeb ve Sourirajan, selüloz asetat kullanarak ilk asimetrik membranı geliştirmiş ve % 98 sodyum klorürü (NaCl) reddetme kabiliyetine sahip olmuştur [30]. Bununla birlikte, selüloz asetat membranın yüksek pH duyarlılığı ve yüksek sıcaklığa daha az toleransı gibi kendi sınırlamaları vardır.

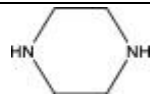
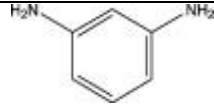
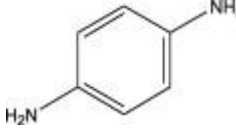
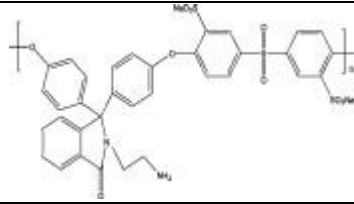
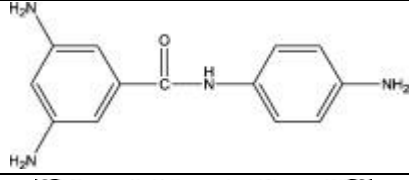
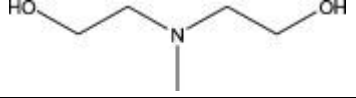
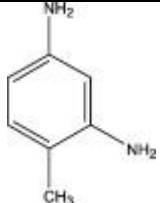
Genel olarak TFC RO membranları, gözenekli bir membranın yüzeyi üzerinde bir PA ince seçici tabaka oluşturularak ara yüzey polimerizasyonu yoluyla hazırlanır. Çoğunlukla, MPD ve TMC PA tabakasının iki ana aktif monomeridir [9]. Farklı özelliklerde TFC membranları geliştirmek için farklı türevlerde aminler ve asit klorür de kullanılmıştır. Şekil 2.6, gözenekli yüzey üzerindeki aktif PA katmanının yapısını şematik olarak göstermektedir [29]. Arayüzey polimerizasyonu kavramı, 1965 yılında ilk kez Cadotte ve Morgan tarafından tanıtılmıştır ve 45 yıldan fazla süredir bilinmektedir [31].



Şekil 2.6: Mikro gözenekli yüzeyin üzerinde oluşturulan PA aktif tabaka ile ince film kompozit membranın şematik temsili.

Kullanılan monomerlerin ve bunların kimyasal özelliklerinin ince filmin gözenek boyutu, kalınlığı, pürüzlülüğü ve hidrofilitesinde önemli rolü vardır. Lau ve ark.'nın çalışmalarından Tablo 2.6, ince filmin oluşumu için kullanılan mevcut ve yeni geliştirilen monomerleri göstermektedir [31].

Tablo 2.6: TFC membranı için monomerlerin güncellenmiş listesi.

Amin monomer	Kimyasal yapı	Moleküler ağırlık
Piperazin		86.14
m-fenilendiamin		108.10
p-fenilendiamin		108.10
Sülfonatlı kardiyol (arilen eter sülfon)		774.71
3,5-Diamino-N- (4-aminofenil) benzamid		242.27
Metil-dietanolamin		119.16
m-fenilendiamin-4-metil		122.17

Tablo 2.6: Devamı.

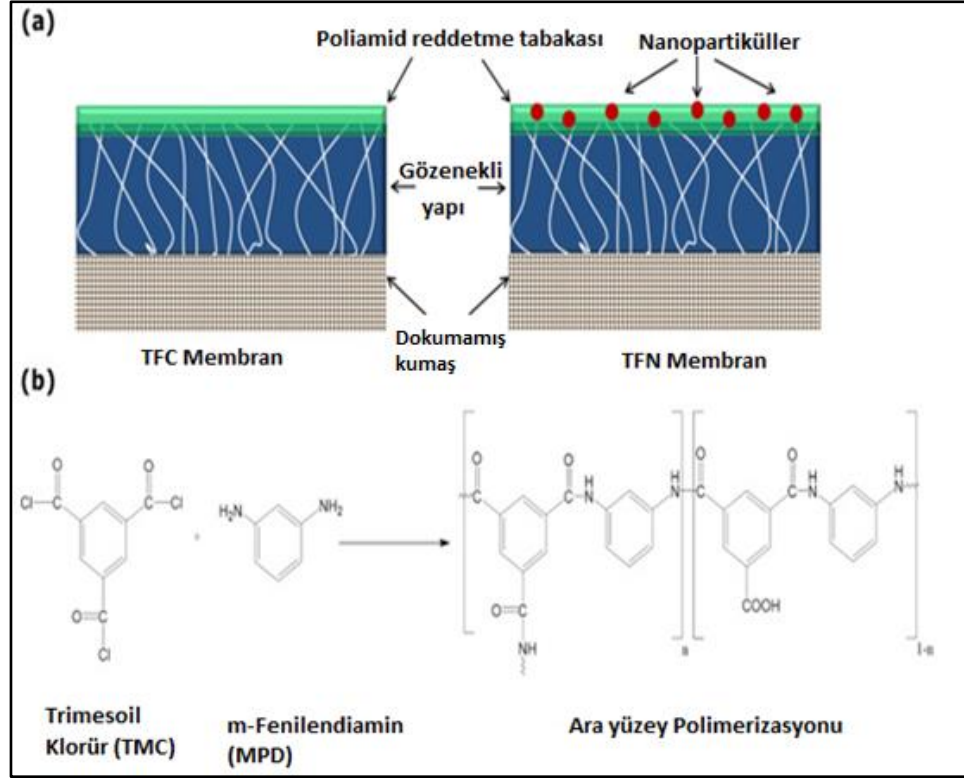
Sülfonik asit ve amino grupları içeren sülfonatlı poli (arilen eter sülfon)		636.5
Asit klorür monomeri	Kimyasal yapı	Moleküler ağırlık
Trimesoyl klorür		265.48
İzoftalil klorür		203.02
mm-Bifenil tetraasil klorür		404.03
Sikloheksan-1,3,5-trikarbonil klorür		271.53
Piridin-2,4,6-trikarbonil triklorür		266.5

2.4. Tuzsuzlaştırma Membran Teknolojisinde Gerçekleşen Son Gelişmeler

Geçtiğimiz on yılda, yeni malzemeler (örneğin, akuaporin proteinleri, karbon nanotüpler, gözenekli grafen ve grafen oksit), yüksek performanslı desalinasyon membranlarının sentezlenmesi için kullanılmıştır. Bu malzemeler kullanıldığında, gelişmiş TFC poliamid ters ozmoz membranlarına kıyasla birkaç kat daha fazla su akısı elde edilebilmektedir.

Bu yeni malzemeler, ultra geçirgen ve tıkanmaya karşı dayanıklı membranların yapımında muazzam gelişmeler sağlamıştır. Son on yılda bu konuda yapılan araştırmaların sayısında farkedilir bir artış olmuştur [32].

Tipik bir TFC membranı üç tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.7.a): 1-Yoğun bir poliamid reddetme tabakası, 2-Yaygın olarak polisülfon veya polietersülfondan yapılmış gözenekli bir yapı ve 3-Dokunmamış kumaş bir yapı. Membranın su geçirgenliğini ve tuz reddetme kapasitesini belirleyen poliamid ret tabakası, sulu organik fazda bir asit klorür monomeri ile bir amin monomerinin ara yüzey polimerizasyonu ile hazırlanabilir (Şekil 2.7.b). Araştırmacılar ayırma performanslarını ve tıkanmaya karşı dayanıklılık özelliklerini arttırmak için TFC poliamid membranların yapısını ve kimyasını optimize etmek için çeşitli girişimler denemiştirler [7]. Tipik yaklaşımlar arasında değişen monomer tipleri ve konsantrasyonları, membran yüzey modifikasyonu sayılabilir. TFC poliamid membran yapısını ve kimyasını optimize etmek için değişen monomer ve konsantrasyonları, yüzey modifikasyonları gibi çalışmalara rağmen, son teknoloji TFC poliamid membranların su geçirgenliği nispeten düşük kalır [32].



Şekil 2.7: a) TFC membran ve ince film nanokompozit (TFN) membranının membran yapısının şematik diyagramı, b) TMC, MPD kullanılarak poliamidin ara yüzey polimerizasyonu.

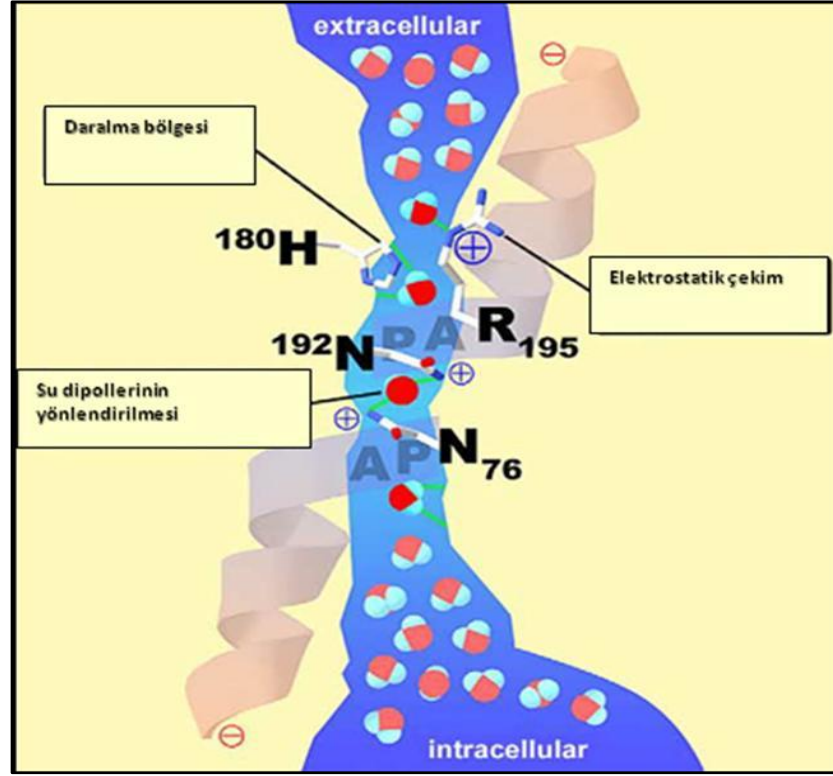
2007 yılında Hoek ve arkadaşları tarafından TFC membranları için önemli bir gelişme ortaya çıkmıştır [33]. Bu araştırmacılar, arayüzey polimerizasyon işlemi sırasında poliamid ret tabakasına gözenekli zeolit nanopartikülleri (giriş gözenek boyutu $\sim 4 \text{ Å}$) ilave etmişlerdir. Gözenekli zeolit nanopartiküller boyut dışlama yoluyla çözünmüş tuzları hariç tutarken, azaltılmış hidrolik dirençle sahip tercihlili su yolları sağlamıştır. TFN membranının su geçirgenliği, zeolit ilave edilmemiş TFC membranı ile karşılaştırıldığında neredeyse iki katına çıkmıştır. Aynı zamanda tuz reddi tehlikeye girmemiştir. Mezoporous silika ve metal-organik yapı gibi diğer gözenekli nanopartiküller de benzer geçirgenlik artırıcı etki göstermiştir [32]. Deng ve arkadaşları [34], 3 nm'ye kadar gözenek boyutu olan küçük gözenekli silika partikülleri için, TFN membranlarının, su geçirgenliklerini geliştirirken, tuz reddini koruyabildiğini bildirmiştir. Araştırmacılar ayrıca, TFN membranlarının sentezi için gözeneksiz nanopartiküllerin (Silika, gümüş ve TiO_2 gibi hidrofilik gözenekli olmayan nanoparçacıkların) yüklenmesi çoğu zaman, kontrolleri ile karşılaştırıldığında su geçirgenliğinin arttığını göstermektedir.

TFN membranının yapısındaki poliamid, reddetme tabakasındaki kusurları en aza indirmeye ve böylece yüksek tuz reddini muhafaza etmeye yardımcı olur. Nanopartiküllerin eklenmesi, TFC poliamid membran üretimi için orijinal olarak tasarlanan mevcut membrana kolayca ilave edilebilir. Bununla birlikte, TFN membranının ayırma performansı artar çünkü performansları büyük ölçüde poliamid tabaka ile sınırlıdır. Poliamid tabakanın kullanımı, TFN membranlarını klor saldırısına karşı daha savunmasız hale getirir. Bu nedenle, daha iyi membranlar ve desalinasyon için yeni materyallere ihtiyaç vardır [32].

2.4.1. Tuzsuzlaştırma Membranlarını Sentezlemek İçin Yeni Materyaller ve Yöntemler

2.4.1.1. Akuaporin

Doğa, tuzsuzlaştırma için mükemmel bir çözüm sağlar. Su molekülleri biyolojik hücreler boyunca, akuaporinler (AQPs) olarak bilinen bir grup transmembran proteinleri yoluyla taşınır. Sutaşıma kanalları bir kum saati şeklini andıran AQP'ler, yüksek seçiciliğe sahip su molekülleri iletmede oldukça verimlidir. AQP1 Peter Agre tarafından 1991 yılında keşfedilen en eski su kanalı proteindir. Şekil 2.8'de gösterilen AQP1'in kum saati şekilli kanalı yaklaşık 20 Å uzunluğunda bir iç geçide sahiptir ve geçitin en dar kısmı yaklaşık 2,8 Å'dır. Geçitin ortasına yakın olan asparajin (Asn, N proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir) grupları, pozitif yüklü bölgelere yol açmakta ve girişin geri kalan kısmı oldukça hidrofobiktir. Bu özel yapı, su moleküllerini sıralayla hidrofobik duvardan çok az sürtünme kuvveti ile tek boyutlu bir geçitin içine sokar. Minik daralma, tek bir su molekülünün sadece bir seferde kanaldan geçmesine izin verir. Geçidin içindeki pozitif yüklü alanlar, su moleküllerinin yük etkileşimi ve asparajin grupları ile hidrojen bağlanması yoluyla geçirdikleri için doğru bir şekilde yönlendirilmesini sağlarlar [35]. Birleşik daralma bölgesi ve yük çekimi, protonlar da dahil olmak üzere çözücülerin neredeyse mükemmel şekilde reddedilmesine neden olur.



Şekil 2.8: AQP1 protein kanalından (kesit görünümü) su transferinin şematik yapı ve mekanizması.

AQP1 kanalının üç özelliği su için seçiciliği belirler: (a) Daralma bölgesi; AQP1 kanalındaki en dar alan $2.8 \text{ \AA}$ 'ya yakındır (yaklaşık olarak tek bir su molekülünün çapı). (b) Elektrostatik çekim; Gözeneklerin en dar yerinde bulunan amino asit, Arginin (Arg-195), protonlara karşı bir bariyer oluşturur. (c) Su dipollerinin yönlendirilmesi; Su molekülünü yeniden yönlendirebilen pozitif yüklü iki kutuplu kanalın ortasındaki iki helezon birleşir [35].

Membran sentezi için, *Escherichia coli* hücrelerinde bulunan Akuaporin-Z (AqpZ), yaygın olarak kullanılır. AqpZ'nin temel özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir. Durdurulmuş akış ölçümlerinden elde edilen verilere göre, AqpZ'nin su geçirgenliği yaklaşık $2-10 \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{s}$ 'dir [36], [37]. Kumar ve çalışma arkadaşlarına göre [38], AqpZ içeren polimerik kesecikler % 100 tuz reddi ile $\sim 600 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$ kadar yüksek su geçirgenliğine sahiptir. Bu su geçirgenliği, mevcut TFC poliamid membranlardan 2-3 kat daha yüksektir [39]. Bu özellikler, AQP'leri yüksek geçirgenlik membranları hazırlamak için ideal adaylar yapmaktadır. Paralel olarak, araştırmacılar yapay çok moleküllü su kanallarını sentezlemeye çalışmıştır. Yapay su

kanallarının su geçirgenliđi iyi olmasına rađmen, dođal AQP su kanallarınınkinden daha dűűűk kalmıűtır [32].

2.4.1.2. Karbon Tabanlı Materyaller

Karbon tabanlı malzemeler (karbon nanotűpler (CNTs), nanoporous grafen (NPG) ve grafen oksit (GO)) umut veren membran materyalleri olarak ortaya çıkmıűtır. Bu malzemelerin su reddetme űzelliđi, hem su kanal boyutlarına hem de kimyasal modifikasyonlara (amin karboksil ve diđer kimyasal grupların varlıđına) bađlıdır. Kanal boyutları sentez koűulları ile belirlenen CNT ve NPG'den farklı olarak, GO'nun karakteristik kanal bűyűklűđű, oksidasyon derecesi ve űűzelti ortamına bađlıdır [32]. AqpZ, CNT, NPG ve GO iűin anahtar űzellikler Tablo 2.7 de űzetlenmiűtir.

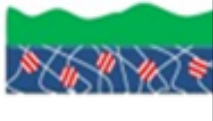
Tablo 2.7: AqpZ, CNT, NPG ve GO 'nin malzeme özellikleri.

	AqpZ	CNT	NPG	GO
Malzeme	Doğal protein	1-D karbon malzeme	2-D Karbon malzeme	2-D Karbon malzeme
Karakteristik kanal boyutu (Å)	İyi tanımlanmış kum saati şeklindeki kanal [52], gözenek boyutu ~ 3 Å	İyi tanımlanmış silindirik gözenekler (e.g., ~ 13–20 Å)	1-atom kalınlığında grafen tabakasında nano boyutlu gözenekler, Muhtemelen eşit olmayan gözenek boyutları ile. (örneğin, plazma aşındırma işleminden elde edilen, ~ 5-10 Å)	Bitişik grafen oksit tabakaları tarafından oluşturulan kanallar, oksidasyon veya çözelti ortamının derecesine bağlı olarak kanal büyüklüğü.
Ayırma özellikleri	~ 600 L m ⁻² h ⁻¹ bar ⁻¹ ; yaklaşık % 100 NaCl itme (AQP içeren keseciklerin stopped-flow ölçümlerinde elde edilen)	Gaz geçirgenliği, Knudsen difüzyon modelinin tahminlerinden > 10 kat daha yüksektir; Deneysel Su geçirgenliği, sürekli hidrodinamiklerden hesaplanan sonuçlardan > 1000 kat daha yüksektir	~ 3.6 × 10 ⁶ L m ⁻² h ⁻¹ ; yaklaşık % 100 KCl itme 40 °C 'de 5-µm-çaplı bir numune için (Bir fırın içinde yerçekimi ile çalışan bir testten elde edilen)	Su geçirgenliği helyumdan en az 10 ¹⁰ kat daha hızlıdır (1 µm kalınlığında bir GO membranı ile ağırlık kaybı ölçümlerinden elde edilir); su geçirgenliği ve reddedilmesi ara tabaka aralığına duyarlıdır.
Kirlilik önleyici özellikleri	Literatürde bildirilmemiş	Antimikrobiyal ve hidrofilik	Literatürde bildirilmemiş	Yapışma önleyici (hidrofilik nedeniyle ve antimikrobiyal)
Elektrik iletkenlik	Hayır	Evet	Evet	Hayır

2.4.2. Yeni Tuzsuzlaştırma Membranları İçin Genel Bir Çerçeve

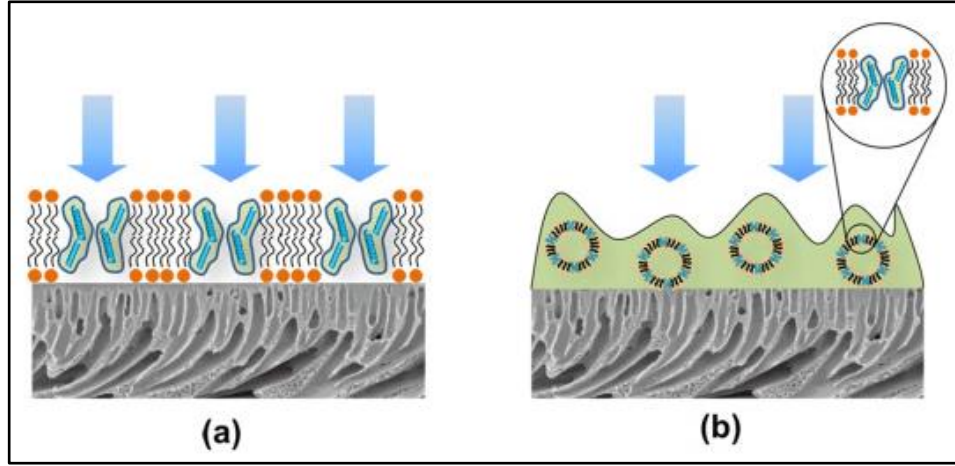
Yukarıda sözü edilen yeni malzemeler (AQP'ler, CNT'ler, NPG ve GO) tarafından hazırlanan yeni tuzsuzlaştırma membranları, yerlerine ve işlevine göre dört genel kategoride Tablo 2.8 sınıflandırılabilir.

Tablo 2.8 Yeni tuzsuzlaştırma membranları.

	Membran türü	Üretim yöntemleri	Performans geliştirme	Yeni aday malzemeler
	Birincil reddetme katmanı (PRL) membran	Yeni malzemeler doğrudan bir destek tabakaya düzenli olarak uygulanır. Membran performansı öncelikle yeni materyaller ile belirlenir.	Devrim niteliğinde gelişme	AQP'ler, CNT'ler, NPG ve GO
	İnce film nanokompozit (TFN) membran	Yeni malzemeler tuzdan arındırma kalıbına dahil edilir. Membran performansı büyük ölçüde tuz itme tabakasını oluşturan materyalle sınırlıdır.	Kısmi gelişme	AQP'ler, CNT'ler ve GO
	Yüzeyde bulunan nanokompozit membran (SLN)	Yeni malzemeler, doğrudan destek tabakaya kirlenme kontrolü için bir reddetme tabakasının yüzeyi üzerine yapıştırılmaktadır.	Kirlenme önleyici gelişme	CNT'ler ve GO
	Karışık kalıp destek tabaka (MMS) membranı	Destek tabakasının porozitesini ve hidrofilitatesini arttırmak için yeni malzemeler bir destek tabakasının içine gömülür.	Dolaylı gelişme	CNT'ler ve GO

2.4.2.1. AQP Tabanlı Tuzsuzlaştırma Membranlarına Genel Bakış

Kumar ve arkadaşları ilk olarak AQP tabanlı biyomimetik membranların üretimini ve AQP içeren kesecikleri kullanarak potansiyellerini göstermişlerdir [38]. Bu öncü çalışmaya hızla geçtiğimiz on yılda pek çok araştırmacı tarafından yapılan ek çalışmalar eşlik etmiştir. Bu yeni malzemeyi destekleyen membran türleri Şekil 2.9'da gösterildiği gibi; AQP-tabanlı birincil reddetme katmanı (PRL) membranları ve AQP-tabanlı TFN membranları diye ikiye ayrılır.



Şekil 2.9: AQP-tabanlı tuz giderme membranlarının şematik diyagramları. a) AQP'lerin bir indirgeme tabakası oluşturmak için gözenekli bir alt tabaka (gri) üzerinde bir lipid veya polimerik iki tabakalı olarak monte edildiği AQP-tabanlı PRL membranları b) AQP içeren keseciklerin gözenekli bir alt tabaka (gri) üzerinde yoğun bir polimer tabakası (yeşil) içinde kapsüllendiği AQP bazlı TFN membranları.

2.4.2.1.1. AQP Tabanlı PRL Membranları

AQP-tabanlı PRL membranların yapısı, lipid iki tabakalı AQP'lerin suyun taşınmasını ve çözünmüşleri reddetmesini düzenlediği biyolojik hücresel membranlara benzemektedir. Bu tasarım, nispeten yüksek tuz reddi ile ultra hızlı su geçirgenliği ile membranların potansiyel birleşimine izin verir.

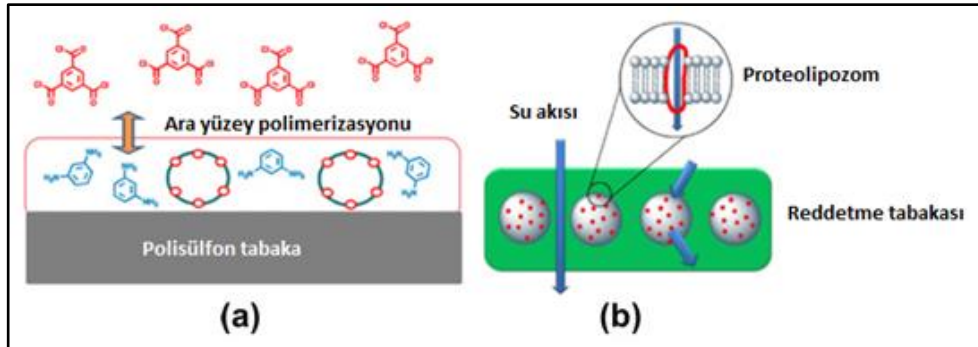
Kaufman ve meslektaşları, ilk olarak, bir ticari nanofiltrasyon membranında lipid çift katmanlarını oluşturmak için kesecikleri parçalama yaklaşımını geliştirdi [131]. Bu yaklaşımlarında lipozomlar (yani, AQP'leri olmayan lipid kesecikler), alt tabaka membranın yüzeyine temas eder ve lipozomlar ve alt tabaka arasındaki etkileşim, keseciklerin düzlemsel lipid çift katmanlarına ayrılmasına neden olur.

PRL membran çalışmalarında doğan sorunlar; kaplanmış membranın toplam geçirgenliğinin azalma riski ve tam yüzey kaplamasının elde edilmesi zorluğudur, ayrıca kapatılmamış bölgeler membran boyunca ciddi tuz sızıntılarına neden olacaktır.

2.4.2.1.2. AQP Tabanlı TFN Membranları

PRL membranlarla karşılaştırıldığında, TFN membranlar daha geniş membran alanında ve membran stabilitesinde üretilebilirler. Yoğun tuz reddetme tabakası (örn; poliamid) sadece yeterli tuz reddi sağlamakla kalmaz, aynı zamanda membranın kimyasal ve biyolojik dayanımını arttırmak için bir koruma kalkanı görevi de görür [32].

AQP tabanlı TFN membranları üzerindeki ilk çalışma Zhao ve ark.'na aittir. Şekil 2.10'da görüldüğü gibi, AQP içeren kesecikleri bir poliamid reddetme tabakasına dahil etmişlerdir [9]. Bu proteoliposomlar, genel su geçirgenliğini artırabilen "tercihli su yolları" olarak hareket ederler. Hazırlanan AQP tabanlı TFN membranları, $\sim 4 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ lik bir su geçirgenliğine ve 5 bar'lık bir basınç altında test edilen $\sim 97\%$ lik bir tuz reddetmesine sahiptir. Bu membran geçirgenliği, kontrol membranlarına kıyasla % 30 daha yüksektir. Yüksek geçirgenlikli nanofiltrasyon membranları hazırlamak için de benzer bir yöntem kullanılmıştır [46], [54]. TFN tasarımındaki su geçirgenliği AQP'lerin yüksek geçirgenlik özelliklerinden tam olarak yararlanabilen PRL tasarımının aksine yoğun tuz reddetme tabakası ile sınırlıdır.



Şekil 2.10: AQP bazlı TFN membran a) AQP tabanlı TFN membranlarının şematik diyagramı, b) TFN membranlarının sutaşıma mekanizmasının kavramsal modeli.

AQP tabanlı membranlar için önemli bir nokta, su kanalı proteinlerinin uzun bir süre boyunca sabit olmasıdır. Bu anlamda, AQP tabanlı TFN membranların yoğun poliamid tabakaları kimyasal ve biyolojik bozulmaya karşı AQP'lere koruma sağlayabilir [32]. Örneğin, Qi ve arkadaşları, AQP-tabanlı TFN RO membranlarının,

yaygın olarak kullanılan kimyasal temizleyicilerine de (sodyum hidroksit, etilendiamintetraasetik asit ve sitrik asit) maruz kaldıklarında performanslarını koruyabildiğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, evsel bir atık suyu kullanarak üç aylık bir süre boyunca uzun vadeli bir test gerçekleştirmişler ve bu süre zarfında AQP tabanlı TFN membranların ve ticari membranların tuz reddetmelerinde, büyük bir değişiklik görmemişlerdir [40].

Tablo 2.9: AQP-tabanlı birincil reddetme katmanı (PRL) membranlarıyla yapılan çalışmalar.

Tür-PRL	Kategori	Akı(LMH)	Reddetme (%)	Test koşulları ve membran alanı (cm ²)	Sonuçlar
AqpZ-DOPC¹	NF	3.6	R _{NaCl} = % 20	1 mM NaCl @1 bar Alanı: 28.3	NF-270 membranına kıyasla hem su akısı azalmış hemde tuz reddetmesi azalmıştır [46].
AqpZ-ABA²	NF	34.2	R _{NaCl} = % 32.9	200 ppm NaCl @5 bar Alanı: 0.071	AqpZ: ABA oranı 1: 50 olan NF membranlarının, düşük tuz reddi ile yüksek su geçirgenliği sağlayabildiği bulunmuştur [55].
AqpZ-DOPC/ DOTAP³	NF	22	R _{NaCl} = % 75	500 ppm NaCl @4 bar Alanı: 19.56	PSS ⁴ (negatif yüklerle) / PEI ⁵ (pozitif yüklerle) / PAN ⁶ gözenekli hidroliz tabakası üzerine AqpZ destekli lipit çift tabakaları yerleştirilmiştir [56].

¹ **DOPC**: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

² **ABA**: methacrylate end functionalized poly(2-methyloxazoline-b-dimethylsiloxane -b-2- methyloxazoline) PMOXA(1000)-b-PDMS(4000)-PMOXA(1000) triblock.

³ **DOTAP**: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan.

⁴ **PSS**: polisodyum 4-stirensülfonat

⁵ **PEI**: polietilenimin

⁶ **PAN**: poliakrilonitril

Tablo 2.10: AQP-tabanlı ince-film nanokompozit (TFN) membranlarıyla yapılan çalışmalar.

Tür-TFN	Kategori	Akı(LMH)	Reddetme (%)	Test koşulları ve membran alanı (cm ²)	Sonuçlar
AqpZ-DOPC	RO	4	RNaCl = % 97 @5 bar	10 mM NaCl @5 bar Alanı: > 200	Polisülfon tabakasına dahil edilen AqpZ proteini arayüzey polimerizasyon yöntemi ile yerleştirilmiştir. Geniş membran alanı elde edilebilir [9].
AqpZ-DOPC	RO	8	RNaCl = % 97.5	500 ppm NaCl @5 bar Alanı: 34.2	AQP'nin dahil olduğu proteolipozomlar, içi boş bir fiber membran tabakası iç yüzeyi üzerinde immobilize edilmiştir ve daha sonra gaz olmayan bir destekli arayüzey tarafından oluşturulan bir poliamid katmanla kaplanmıştır [13].
AqpZ-DOPC	RO	4.1	RNaCl = % 97.2	10 mM NaCl @10 bar Alanı: 42	Uzun süreli kararlılık testi için akuaporin proteinleri PA (poliamid) reddetme tabakasına gömülmüştür [40].

2.5. *Escherichia coli*

Escherichia coli memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşayan Gram negatif bir bakteri türüdür. İlk kez 1885 yılında pediyatrist ve bakteriyolog olan Theodor Escherich tarafından bebek dışkılarında keşfedilmiştir ve adını ondan almıştır; *coli*, "kalın bağırsaktan" demektir. Bakteri biyolojisi bilindiğinden ve üreme koşulları kolay sağlanmasından dolayı laboratuvar ortamında sıkça kullanılmıştır. Mikroorganizmalar arasında hakkında ki en çok bilgi birikimi olan bakteri türüdür.

E. coli, normal bağırsak florasına aittir, biyolojik sınıflandırmada da bağırsaklarda yaşayan bakterilerden oluşan enterik bakteriler ailesinde yer alır. Bakteri çubuk şeklinde olup, boyutları 1-2 µm uzunluğunda ve 0.1-0.5 µm çapındadır. Enterobacteriaceae familyasının koliform grubu içinde yer alır. Koliform grup denince ise, aerob ve fakültatif anaerob, gram negatif, spor oluşturmeyen ve 35°C' de 48 saat içinde laktozdan gaz ve asit oluşturan tüm çubuk bakteriler anlaşılır [50].

E. coli Gram-negatif bir bakteri olduğundan endospor oluşturmaz, pastörizasyon veya kaynatma ile ölür. Memeli hayvanların bağırsaklarında büyümeye adapte olmuş olduğu için en iyi vücut sıcaklığında çoğalır.

Su arıtım alanında *E. coli* her zaman su kirliliğinin bir "göstergesi" olarak kullanılmıştır. Sudaki dışkı miktarı koliform endeks aracılığıyla ölçülmüştür.

Yaygın bir bakteri olmasından dolayı *E. coli* mikrobiyolojide sıkça çalışılmıştır ve moleküler biyolojide bir gereç haline gelmiştir. Biyolojik bilimler çalışan araştırmacılar için ideal bir mikro fabrika gibidir.

Bakteriyel konjügasyon, genetik rekombinasyon kavramları ilk *E. coli* 'de keşfedilmiştir, DNA'nın çoğalması, RNA transkripsiyonu, protein sentezi gibi, moleküler biyolojinin pek çok önemli mekanizması, metabolizmanın çoğu ayrıntısı bu organizmada yapılan araştırmalarla anlaşılmıştır. En az on Nobel Ödülü *E. coli* 'de yapılan araştırmalara dayanır.

E. coli'nin modern genetik mühendisliğinde önemli bir yeri vardır. Araştırmacılar bu bakteriyi büyük miktarda DNA veya protein üretmek amacıyla bir fabrika gibi kullanırlar. Rekombinant DNA teknolojisinin ilk faydalı uygulamalarından

biri *E.coli* 'nin manipüle edilerek onun diyabetli hastalar için insülin üretmesini sağlamak olmuştur [41].

2.5.1. *E. coli* AqpZ

Hücre zarını oluşturan lipid çift katmanındaki su transferinden sorumlu bir dizi proteinin varlığı Peter Agre tarafından 2003 yılında keşfedilmiştir. Bu bulgu akuaporinlerin keşfi olarak tarihe geçmiştir ve Agre'ye Nobel ödülü kazandırmıştır. Akuaporinler, su moleküllerinin geçmesini sağlayan ve diğer tüm çözünen maddeleri reddeden membran proteinleridir. Yapılan çalışmalar sonucu farklı hücre membranlarında akuaporinlerin bulunduğu gösterilmiştir.

Bakteriler de gelişmiş bitki ve hayvanlarda olduğu gibi akuaporinlere sahiptirler. *E. coli* AqpZ akuaporini, ilk olarak Calamita ve arkadaşları tarafından klonlanmıştır [58]. Daha sonra Borgnia ve arkadaşları tarafından karakterizasyon çalışmaları yürütülmüş ve akuaporin tetramerinin gliserol geçirgenliğine karşı oldukça kararlı olduğu gösterilmiştir [50]. *AqpZ*; çeşitli araştırmacılar tarafından (Lian ve ark., Xu ve ark. Ve Wang ve ark.) özelliklerinin incelenmesi için ve Savage ve arkadaşları tarafından detaylı yapı analizi için farklı ifade vektörlerine klonlanmıştır [59], [60], [56].

His etiketli *aqpZ*'nin su taşıma potansiyeli daha önce birçok araştırmacı tarafından karakterize edilmiştir [50], [38], [42]. Farklı alanlarda uygulama potansiyeline sahip olduklarından su arıtımı ve ters osmoz proseslerinde kullanılan filtrasyon membranlarının tuzsuzlaştırma kapasitesinin artırılması amacıyla *E. coli* akuaporini (AqpZ) kullanılmıştır.

2.5.1.1. Tez Kapsamında Kullanılacak Olan GST Etiketli *E. coli* AqpZ Proteini

Bu tez kapsamında üretilip kullanılan *E. coli* AqpZ protein geni GST tag içeren pGEX-4T-2 vektörüne daha önce laboratuvarımızda klonlanmıştır [57]. Glutation S-transferaz (GST) Gen Füzyon Sistemi *E. coli* hücrelerinde üretilen proteinlerin ifadesi, saflaştırılması ve tespiti için kullanılan çok etkin bir sistemdir. Bu sistem IPTG

ile indüklenme sonucunda klonlanan gen ürününün yüksek miktarlarda üretimini sağlar. Bu vektör, klonlanacak olan genin N terminal bölgesine Glutation S Transferaz (GST) geni eklenecek şekilde tasarlanmıştır. Dolayısıyla pGEXT vektörüne klonlanan gen ürünleri yaklaşık 26 kDa civarında bir GST afinite kuyruğu veya etiketi taşırlar. Klonlama ve ifade sonucunda klonlanan gene ekli olan GST etiketi sayesinde hedeflenen protein GST enziminin substratı olan glutation bağlı Sefaroz 4B boncukları ile kolaylıkla saflaştırılabilmektedir. Dolayısıyla saflaştırma yöntemi enzim-substrat ilişkisini içeren bir afinite kromotografi tekniğine dayanmaktadır. GST yüksek protein eldesi, proteolizize direnç ve tek basamakta purifikasyon sağlaması açısından tercih edilmektedir [49].

3. MATERYAL ve METOT

Bu tez çalışmasında akuaporin içeren TFC biyomimetik membranlar hazırlanmış ve membrandaki akuaporin varlığının tuzsuzlaştırma işlemine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaç için daha önce laboratuvarımızda pGEX-4T-2 saflaştırma vektörüne klonlanmış [57] olan *E. coli* akuaporin-Z tekrar üretilmiş ve TFC membran hazırlamak için kullanılmıştır. Saflaştırılan akuaporinlerin işlevlerini yerine getirebilmesi ve istikrarlı kalabilmeleri için lipozomlara yerleştirilmişmiştir. Durdurulmuş akışlı ışık saçılımı spektrometresi ile üretilen proteolipozomların su geçirgenliklerine bakılmıştır. Daha sonra biyomimetik TFC membranın hazırlanması için proteolipozomlar polisülfon membran yüzeyine ara yüzey polimerizasyonu yöntemi yerleştirilmiştir. Membran su geçirme ve tuz reddetme kapasitesindeki değişimi görmek için ölü uçlu filtrasyon sistemi kullanılmıştır. Ayrıca hazırladığımız biyomimetik membranların glikoz, üre ve gliserol reddetme kapasiteleri de belirlenmiştir.

3.1. Akuaporin Proteinlerinin Üretimi ve Saflaştırılması

Akuaporinler hücre zarı proteinleri olduğu için hücre içinde ifade edildikten sonra hücre zarına yerleşmektedirler. Bu nedenle sitoplazmadan değil hücre zarından saflaştırılmaları gerekmektedir. Membran proteinlerinin saflaştırılmak için Erbakan ve arkadaşlarının çalışması örnek alınarak yapılmıştır [42]. İlk olarak pGEX-4T-2-*aqpZ* taşıyan BL21 hücreleri 10 mL LB (% 1 NaCl, % 0.5 yeast extrat, % 1 peptone)'ye eklenerek 4 saat boyunca çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de büyütülmüştür. Büyüme işlemi sonucunda bakteri kültürleri yeni antibiyotikli LB (1000mL) şişelerine ekilmiştir ve 37°C'de gece boyunca çalkalanarak büyütülme işlemi görmüştür. Ertesi gün 1mM olacak şekilde IPTG eklenerek 3 saat boyunca büyütülmeye devam edilmiştir. 10000 xg'de hücreler 15 dk, 4°C'de çöktürülmüş ve bu işlemden sonra supernatant atılmıştır. Pellet -30°C'de 1 gece bekletildikten sonra Lysis Buffer'dan (100 mM K₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 1 mM PMSF, 0.02 mg/mL RNase, 1 mg/mL lysozyme at pH = 7.0) 1L LB çözeltisine 15 mL olacak şekilde pellet üzerine

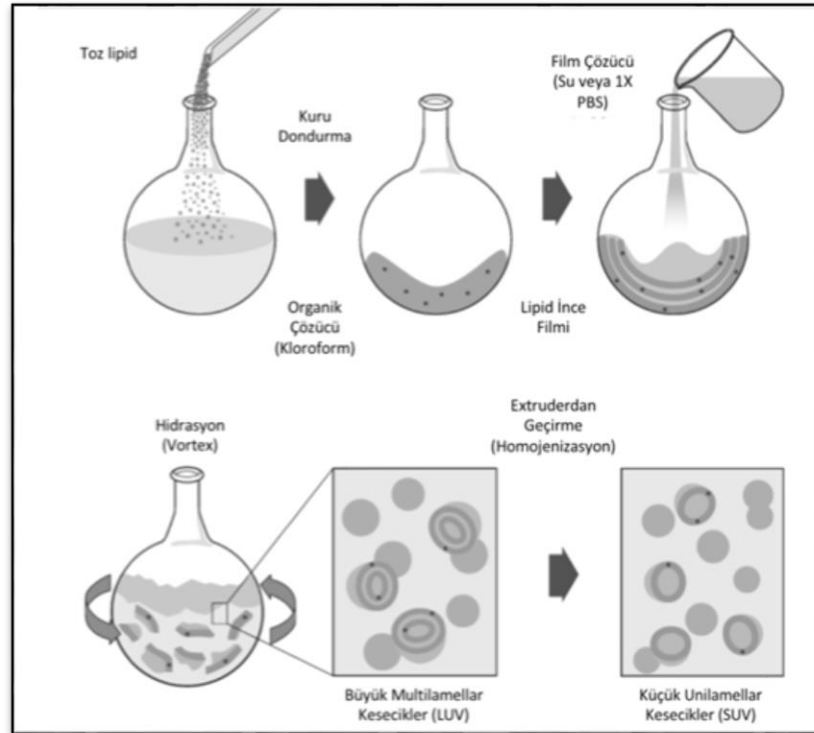
eklenmiş ve bu işlemden sonra hücrelerin çözünmesi beklenmiştir. Toplanan hücreler 4°C'de sonikatörde (Hielsher) parçalanmıştır (min. 1dk'dan 30 tekrar, 0.5 cycle). 12.000 xg'de 4°C'de 20 dk santrifüj edilmiş ve bu işlemden sonra supernatant alınmıştır. Supernatantın içerisindeki membran proteinlerini çöktürme işlemi için 100.000 xg'de 4°C'de 1 saat 10 dakika ultra santrifüj işlemi yapılmıştır ve bu işlemden sonra peletin içerisinde ki supernatant atılmıştır. Pelletin üzerine 3 mL Solubilization Buffer (% 5 Triton-X, 100 mM K₂HPO₄ (pH = 7.0), 200 mM NaCl, % 10 glycerol, 2 mM β -mercaptoethanol (β ME)) eklenmiş ve pelletin solüsyon içerisinde tamamen çözünmesi için numune bütün gece buzda bekletilmiştir. Numune 0.45 μ 'lık fitreden geçirilmiştir. Supernatant Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) boncukları ile 1 saat oda sıcaklığında (23°C'de) çalkalanarak (100 rpm) inkübe edilmiştir. Numune boncuk karışımı karışım hacminin 6 katı kadar Wash Solution (100 mM K₂HPO₄ (pH = 7.0), % 1 Triton-X, 200 mM NaCl, % 10 glycerol, 2 mM β ME) ile yıkanmıştır. İstenen proteinler % 10 Glycerol içeren 10mM Reduced Glutathione çözeltisi ile ayrıştırılmıştır.

3.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi (SDS-PAGE) Analizi

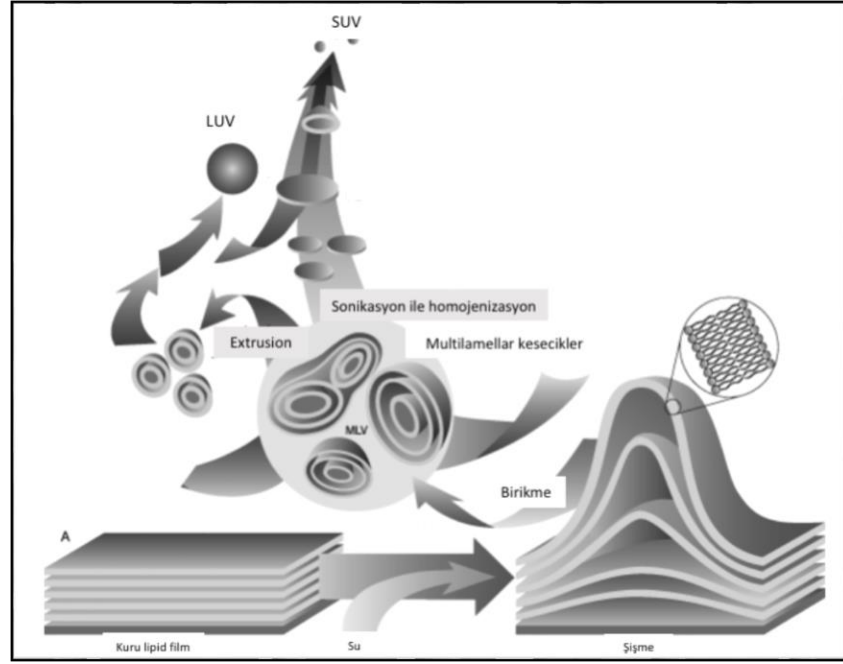
Saflaştırılan proteinler % 12 ayırma (1.6mL distile su, 2mL % 30 acrilamid, 1.3 mL 1.5M tris, 50 μ L % 10 SDS, 100 μ L % 10 amonyum per sülfat ve 10 μ L TEMED) ve % 5 istifleme (1.5 mL distile su, 416 μ L % 30 acrilamid, 0.625 mL 0.5M tris, 25 μ L % 10 SDS, 100 μ L % 10 amonyum per sülfat ve 7.5 μ L TEMED) protein jelleri ile hazırlanmıştır. Hazırlanan protein jeli SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Proteinler, Coomassie brilliant blue R250 (% 10 asetik asit, % 0.006 commasie blue, % 90 su) ile hazırlanan boya ile 6:1 (protein: boya) oranında karıştırılarak jellere yüklenmiştir. Saf proteinlerin yanına ekler kısmında verilen protein markerları (thermoficher page ruler prestained protein ladder, fermentas prestained protein MW marker) yüklenmiştir. Jeller güç kaynağından ilk başta 100 V ile beslenmiştir ve numuneler separating jelle geldiklerinde voltaj 200V'a çıkarılmıştır.

3.3. Lipozom Hazırlama

Lipozomlar film rehidrosyon yöntemi ile hazırlanmıştır [9]. Prosedür akışı Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Deneyler esnasında DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Avanti Polar Lipids INC, Alabama, USA) lipit kullanılmıştır. DOPC istenilen konsantrasyona göre round bottom flaska eklenmiştir. Eklenen sıvı döndürülerek iyice uçurulmuştur. Bu işlem sayesinde lipidler cam yüzeyinde ince bir film oluşturmuştur. +4°C’de 1-2 saat bekletilerek rehidrasyon aşaması için istenilen son konsantrasyona göre su veya 1X PBS (phosphate buffered saline) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) ilave edilmiş ve vortekslenerek ince film haline getirilen lipidler çözündürülmüştür. 21 kere extruder (Avanti Polar Lipids INC, Alabama, USA) kullanılarak lipozomlar yuvarlak ve aynı boyuta getirilmiştir. Bu işlem 200 nm por çapına sahip membran (Whatman, Maidstone, UK) için kullanılmıştır. Lipozomların aynı boyuta getirilmesi ile polydispersity index (PDI) düşürülmüştür. Bu prosedür sırasında lipozomların oluşumu Şekil 3.2’de kavramsal olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1: İnce film yöntemi ile lipozom yapımı.



Şekil 3.2: Lipidlerin oluşum basamakları.

3.3.1. Akuaporin Proteini İçeren Lipozomların Hazırlanması

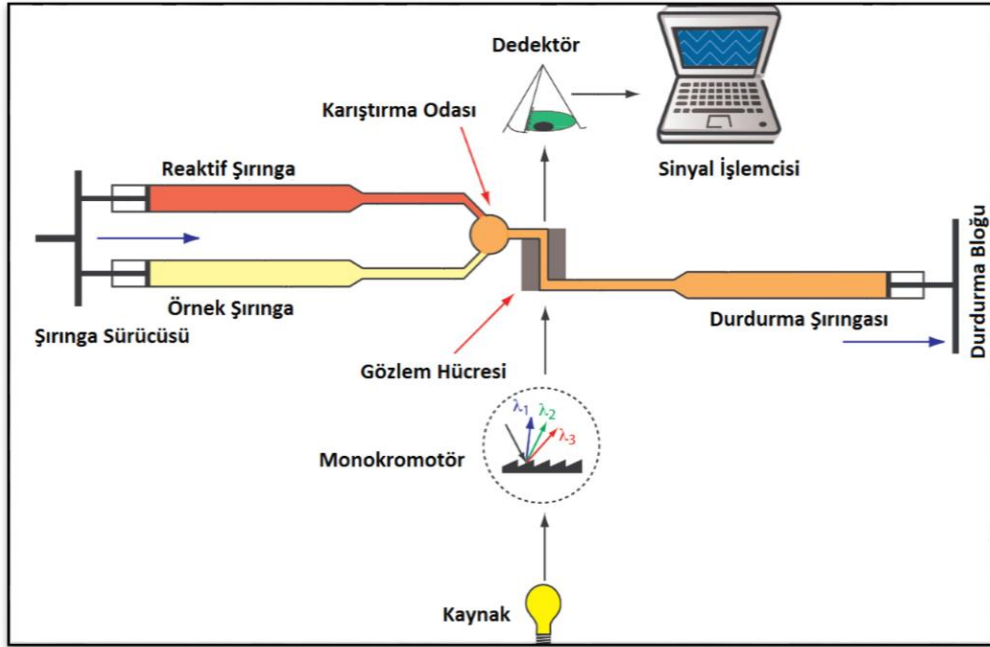
Akuaporin içeren lipozomlar elde etmek için vorteks basamağından sonra, protein: lipid oranı 1:200 olacak şekilde protein ve % 1 olacak şekilde Octyl β -D-glucopyranoside (OG) deterjanı (Sigma-Aldrich, USA) eklenmiştir. Protein ve deterjan eklenen çözelti 1 saat oda sıcaklığında karıştırılarak bekletilmiş ve deterjan eklenmesi ile yüklenen proteinlerin lipozomlara girmesi sağlanmıştır. Lipozomlar yağdan oluştukları için deterjan lipozomların yapılarını bozmaktadır. Bu nedenle proteinlerin lipozomlara yerleştirilmesinin ardından Bio-Beads (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) eklenerek deterjan çözeltiden uzaklaştırılmıştır.

3.3.2. Lipozomların Karakterizasyonu

Lipozomların boyutları ve polydispersity index (PDI) değerleri oda sıcaklığında (22°C) Nano Zetasizer (NanoZS, Malvern Instruments Limited, UK) kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.3. Lipozomların Su Geçirgenliklerinin Tespiti

Lipozomların su geçirgenlikleri durdurulmuş akışlı ışık saçılımı Spektrometre (SX20 Stopped flow light scattering spectrophotometer, Applied Photophysics, UK) cihazı ile ölçülmüştür. Su geçirgenlikleri için ozmotik çözelti olarak NaCl içeren su kullanılarak tespit edilmiştir. Şekil 3.3’de sistemin çalışma mekanizması verilmiştir. Sistemde bulunan reaktif şırıngaya lipozomlu çözelti, örnek şırıngaya da tuzlu su ilave edilmiştir. Cihazın çalışma prensibi bu iki çözeltinin basınç sürücü kuvvet altında belirli miktarlarda karıştırma odasında hızlı bir şekilde karışmalarını sağlamak üzerine kuruludur.



Şekil 3.3: Durdurulmuş akışlı ışık saçılım Spektrometre cihazının çalışma mekanizması.

Karışım neticesinde ozmolarite farkı nedeniyle lipozomlar bünyelerinde bulundurdıkları suyu dışarı bırakmaktadırlar. Bu olay 5–20 ms gibi kısa bir sürede gerçekleşmektedir. Su çıkışının hızı ışık saçılımı ile belirlenmektedir. Bu çalışmada, protein yerleştirilen lipozomların su çıkış hızlarının, protein içermeyen boş lipozomların su bırakma hızlarından daha hızlı olması beklenmektedir.

Su geçirme hızı (P_f) eşitlik 3.1’e göre hesaplanır. Bunun için osmolarite ($\Delta\pi$) değeri bilinmelidir. Osmolarite değeri solüsyonların iletkenlikleri ölçülerek

hesaplanmıştır. PBS içerisinde diğer moleküllere oranla tuz konsantrasyonu yüksek olduğu için tuzun iletkenliğinden PBS için olan iletkenlik çıkarılır. İletkenlik değeri ($\mu\text{S}/\text{cm}$) mg/L 'ye çevirmek için 0.64 sabit sayısı ile çarpılarak iyon miktarı hesaplanmıştır. 0.85 M NaCl ($71197.7 \mu\text{S}/\text{cm}$) kullanılmıştır. 1 X PBS için iletkenlik $15950.2 \mu\text{S}/\text{cm}$ 'dir.

- $\Delta \text{iletkenlik} = 71195.7 \mu\text{S}/\text{cm} - 15950.2 \mu\text{S}/\text{cm} = 55245.5 \mu\text{S}/\text{cm}$
- $\text{mg}/\text{L NaCl} = 55245.5 \mu\text{S}/\text{cm} \times 0.64 = 35357.1 \text{ mg}/\text{L} = 35.36 \text{ g}/\text{L}$
- $[\text{NaCl}] = \frac{35.36 \text{ g}/\text{L}}{58.44 \text{ g}/\text{mol}} = 0.61 \text{ M}$
- NaCl molekülü 2 iyon içerdiği için $\Delta\pi = 1.2 \text{ Osm}$

Su çıkış hızı ölçüm sonucunda elde edilen k değeri ile doğru orantılıdır. Ölçülen k değeri verilen eşitlik 3.1'de yerine konarak su geçiş hızı (P_f) bulunmaktadır. Formülde; S/V_0 değeri lipozomların yüzey alanının başlangıç hacmine oranı, V_w suyun kısmi molar hacmi ($18 \text{ cm}^3/\text{mol}$), $r = 87.4 \text{ nm}$ (200 nm çapındaki boş lipozom için Nano Zetasizer ölçüm sonucu), $\Delta\pi$ ise lipozom içerisindeki sıvı ile lipozom dışarısında bulunan sıvının arasındaki osmolarite farkıdır.

$$P_f = \frac{k}{S/V_0 \times V_w \times \Delta\pi} \quad (3.1)$$

3.4. Biyomimetik Membranların Hazırlanması

3.4.1. Akuaporin Keseciklerinin Sabitlendiği Membran Tabakanın Hazırlanması

İlk önce Şekil 3.4'te gösterildiği gibi bir kapta % 1 MPD (m-Phenylene-diamine), % 0.1 SDS (Sodium dodecyl sulphate) karıştırılır ve 1 mg/mL (veya belirtilen farklı konsantrasyonlarda) eklenir. Hazırlanan solüsyonun içine hazır alınan PS membran 10 dakika batırılmıştır (batırılan kontrol membran proteo-lipozom içermez). Batırılmış membran, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında yatay bir şekilde asılı beklemiş ve fazla çözelti azot gazı ile giderilmiştir. Yüzeyi MPD çözeltisi ile kaplı

olan PS substrat üzerine itici katmanı oluşturmak için trimesoyl chloride (TMC) çözeltilisi (n-Heksan içinde % 0.1 TMC) dökölmüştür.



şekil 3.4: Hazırlanan MPD çözeltileri .



şekil 3.5: Kaplaması yapılan membranlar.

Ardından fazla monomeri gidermek için membranlar gece boyunca akan musluk suyu altında tutulmuştur. şekil 3.5’de gösterildiği gibi işlem sonunda membranlar saf suda saklanmıştır

3.5. Ölü Uçlu Filtrasyon Sistemi İle Membran Filtrasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Deneylerde Sterlitech Corporation ölü uçlu (death-end) membran filtrasyon sistemi (HP4750, USA) kullanılmıştır (Şekil 3.6). Membran alanı 14.6 cm² ve besleme çözeltisi 250 mL'dir. Membran, sistem içerisindeki disk üzerine yerleştirilmiş ve daha sonra ekipman bir araya getirilmiştir. Filtrasyon esnasında numune 300 rpm'de karıştırılmıştır. Biriken filtrat bilgisayara bağlı hassas terazi ile ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarına sahip çözeltiler iki farklı basınç uygulanarak filtre edilmiştir. Hazırlanan membranların aynı zamanda farklı çözünür maddelerin (gliserol, üre ve glikoz) filtrasyonundaki performansları da test edilmiştir.

Membran akıları (J_v) ve tuz reddetme hızları (J_{SR}) (gliserol, üre ve glikoz için çözünür madde reddetme hızı) aşağıda verilen eşitlikler, 3.2 ve 3.3, kullanılarak hesaplanmıştır.

$$J_v = \frac{V}{A} \times \Delta t \quad (3.2)$$

$$J_{SR} = (C_{inf} - C_{eff}) \times J_v \quad (3.3)$$

V (L) belirli bir zaman periyodunda toplam filtrelemeyi, t (sa) zamanı, A (m²) membran alanını, J (L/m².sa) akışı, C_{inf} giriş çözeltisinin tuz yoğunluğunu ve C_{eff} membrandan süzülen çözeltinin tuz yoğunluğunu (çözünür madde yoğunluğu) göstermektedir.

A (su geçirgenliği), B (çözünür madde geçirgenliği) ve R (reddetme) değerleri sırasıyla eşitlik 3.4, 3.5 ve 3.6 ile hesaplanmıştır.

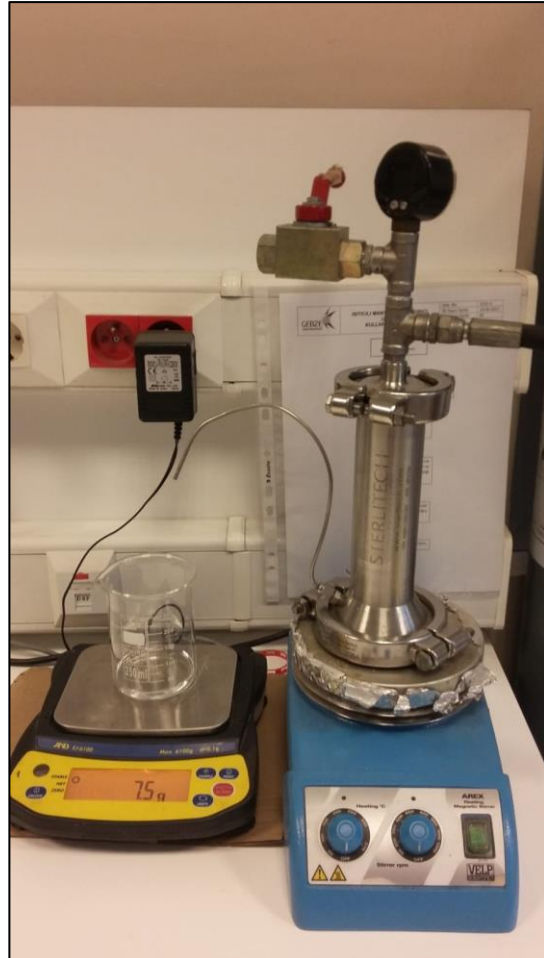
$$A = \frac{J_v}{\Delta P - \Delta \pi} \quad (3.4)$$

J_v akıdır, ΔP uygulanan basınçtır ve $\Delta \pi$ membrandaki ozmotik basınç farkıdır.

$$B = \left(\frac{1}{R} - 1 \right) \times J_v \quad (3.5)$$

$$R = \frac{(C_f - C_p)}{C_f} \quad (3.6)$$

R, Reddetme değeri, Cp ve Cf, sırasıyla süzöntü ve besleme çözeltilerinde çözünen konsantrasyondur.



Şekil 3.6: Ölü uçlu filtrasyon Sistemi.

3.5.1. Tuz Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Solusyonların iletkenlik değ erler iletkenlik ölçer ile  l  lm  st r. Alınan iletkenlik verileri 0.64 sabit sayısı ile çarpılarak mg/L iyon miktarı hesaplanmıştır.

3.5.2. Glikoz ve Gliserol Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Glikoz ve gliserol Lab Aliance Essence marka HPLC kullanılarak  l  lm  st r. HPLC cihazına numune 0.45  m gözenek geni li ine sahip filtreden s z lm  st r. 45 C'de çalışan kolon fırını içine yerleştirilmiş Tessek Polimer Sugar H form 8  m  eker kolonu ve 45 C'de çalışan refraktif indeks detektörü kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 4 mM sülfürik asit çözeltisi kullanılmış ve akış hızı 0.6 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Cihazın numuneler içerisindeki maddelerin yo unlu unu hesaplayabilmesi için bu maddelerin saf hallerini içeren standart çözeltiler hazırlanarak cihaza verilmiş ve detektörler aracılığıyla elde edilen alan değ erleri kullanılarak standart grafikler ve denklemler elde edilmiştir. Membrandan filtre edilen solüsyon ve çıkan filtrattaki glikoz ve gliserol miktarları standart eğriler referans alınarak hesaplanmıştır.

3.5.3. Üre Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Üre  l  m  için üç değişik solüsyon hazırlanması gerekmektedir:

- Solüsyon 1: 12.5 gr çinko sülfat ve 125 mL 0.25 N sülfürik asit 1 litre saf suda çözülür
- Solüsyon 2: 0.75 N sodyum hidroksit   zeltisi
- Solüsyon 3: 20 gr p-dimetilaminobenzaldehit 1 litre % 96'lık alkol çözeltisinin içerisine eklenir ve üzerine 100 mL hidroklorik asit eklenir ve karıştırılır.

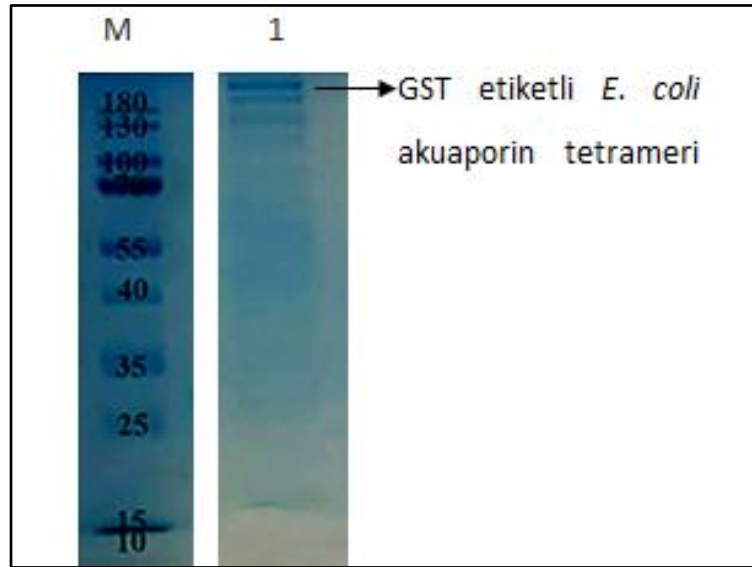
24 mL Solüsyon 1, 100 mL erlen içine eklenir, içine 3 mL üre içeren numune eklenir ve homojen solüsyon elde edilinceye kadar karıştırılır. Bu çözeltinin  zerine Solüsyon 2 den 3 mL eklenip karıştırıldıktan sonra bu çözeltinin 10 mL'si 0.45  m

filtreden geçirilerek üzerine Solüsyon 3'ten 10 mL eklenir ve saf su ile 25 mL'ye tamamlanır. 10 dk sonra 420 nm dalga boyunda spektrometrede ölçüm yapılır.

4. BULGULAR

4.1. Akuaporin Proteinlerinin Hücre Zarından Saflaştırılması

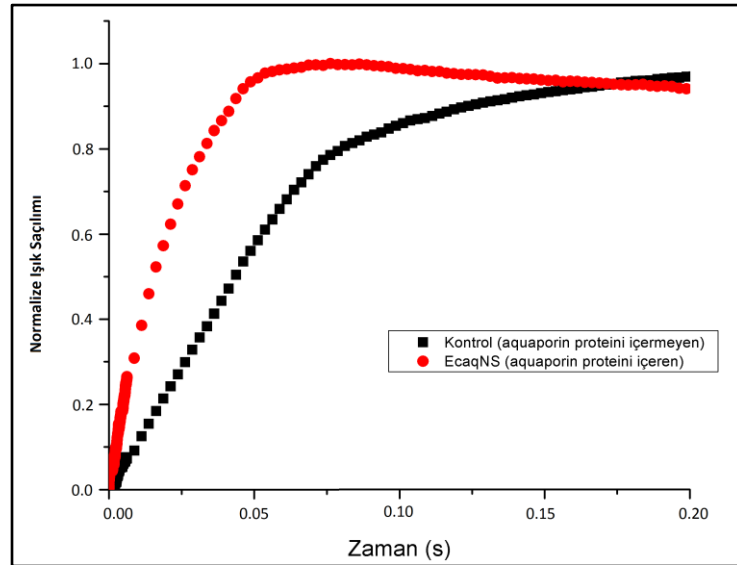
Bu tez kapsamında üretilen ve kullanılan *E. coli* akuaporin geni daha önce laboratuvarımızda pGEXT-4T vektörüne klonlanmıştır [57]. Bu vektöre klonlanan genlerde saflaştırma etiketi olarak glutation S transferaz (GST) bulunmaktadır. *PGEXT-4T-EcaqpZ* vektörü olarak adlandırılan bu vektörü taşıyan *E. coli* BL21 hücreleri Amp/IPTG ortamında yöntem kısmında anlatıldığı şekilde üretilmiş, hücreler toplandıktan sonra klonlanmış olan akuaporin protein hücre zarından izole edilmiştir. Saflaştırma metodu olarak GST sefaroza 4B boncukları kullanılmıştır. GST-EcAqpZ yaklaşık 55 kDa civarındadır ve bu proteinin tetramer formu 220 kDa civarındadır. Saflaştırılan EcaqpZ proteini SDS PAGE (SDS-Poliakrilamid Jel Elektroferez) analizinde tetramer olarak Şekil 4.1’de görülmüştür. Proteinlerin GST saflaştırma yöntemi ile başarılı bir şekilde saflaştırıldığı görülmektedir.



Şekil 4.1: GST etiketli *E. coli* akuaporin tetramerinin (GST-EcAqpZ) SDS-PAGE jel görüntüsü M: Fermentas Prestained Protein MW Marker 1: GST-EcAqpZ tetramer.

4.2. GST-AqpZ'nin Aktivite Ölçümü

Membran yüzeyine yerleştirilmeden önce saflaştırılan GST-AqpZ proteininin aktivitesi SX20 durdurulmuş akışlı ışık saçılımı spektrometre (Applied Photophysics, UK) kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle akuaporinler film rehidrasyon yöntemi DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) lipozomlarına yerleştirilmiştir. Akuaporin taşıyan lipozomların su geçirgenlikleri kontrol olarak kullanılan boş lipozomlar ile kıyaslanmıştır. Lipozomlar boyutları 200 nm olacak şekilde üretilmişlerdir. Normalize ışık saçılım grafiğinden elde edilen k değerleri grafiklerin eğimini göstermektedir. k değerinin yüksek olması lipozomlardaki su geçiş hızının da yüksek olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.2'de görülen grafikte akuaporin içeren lipozomların k değeri 49.28 s^{-1} iken akuaporin içermeyen lipozomların k değeri 17 s^{-1} olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla beklendiği gibi akuaporin taşıyan lipozomlarda su geçiş hızı kontrole kıyasla daha yüksektir. Bu sonuç saflaştırılan akuaporinlerin fonksiyonel olduğunu göstermektedir. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi GST eklenen proteolipozomlarda k değeri kontrolden daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç lipozomlarda su geçişinin artması için akuaporin gibi su geçişinden sorumlu olan bir kanal proteinine gerek olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.2: 0.85M NaCl çözeltisi içindeki 200 nm DOPC lipozomlarının normalize ışık saçılımı ölçüm sonuçları 0.85M NaCl 200 nm DOPC EcAqpZ.

Tablo 4.1: 200 nm fitre boyutundaki DOPC lipozomlarının su geçirgenlik (k) değeri.

+ GST (negatif kontrol)	- <i>EcAqpZ</i> (Kontrol)	+ <i>EcAqpZ</i>
12.51 s ⁻¹	17.04 s ⁻¹	49.28 s ⁻¹

Tablo 4.2’de elde edilen değerlere göre lipozomlardaki akuaporin miktarının artırılması su geçiş hızını artırmıştır, en yüksek k değeri 1:200 akuaporin: lipid oranı kullanıldığında elde edilmiştir. Akuaporin’in su geçirgenliği zeta sizer cihazında alınan gerçek lipozom boyutları kullanılarak hesaplanmıştır. Akuaporinlerin su P_f değeri 42.49×10^{-3} cm /s olarak hesaplanmıştır. Tek bir akuaporin molekülünden geçen su miktarı ise 1.31×10^{-12} cm³/s olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Table 4.2. Proteolipozomlardaki akuaporin: lipid oranının su geçiş hızına etkisi.

Akuaporin lipid oranı + <i>EcAqpZ</i>	Su geçiş hızı (s ⁻¹)
1:800	28.9
1:400	49.3
1:200	56.6
Kontrol	17.04

Table 4.3: 200 nm’lik DOPC lipozomlarında akuaporinlerin su geçirgenliği (P_f).

Aqp Yok (kontrol)		<i>EcAqpZ</i>		
Çap(nm)/Pdl	Su Geçirgenliği (P_f)($\times 10^{-3}$ cm/s)	Çap(nm)/Pdl	Su Geçirgenliği (P_f)($\times 10^{-3}$ cm/s)	Tek <i>EcAqpZ</i> ’nin P_f Değeri (cm ³ /s)
160.27 $\pm$ 3.2/0. 2	14.87	158.33 $\pm$ 4.1/0.1 8	42.49	1.31×10^{-12}

P_f değerleri Zeta Sizer tarafından ölçülen çaplar ve durdurulmuş akışlı ışık saçılma spektrometresi ölçümlerinden elde edilen k değerleri kullanılarak hesaplanmıştır (400 LPR için)

4.3. Akuaporin İçeren Membranların Su Geçirgenliği ve Tuz Reddetme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Akuaporin içeren membranların tuz reddetme ve su geçirme kapasiteleri ölçü- uçlu filtrasyon sistemi ile farklı koşullarda test edilmiştir. Membranların yüzeyindeki akuaporin miktarındaki artış akuaporin taşıyan lipozomların (proteolipozom) miktarının artırılmasıyla sağlanmıştır. Membranlar farklı akuaporin miktarı (0.5, 1 ve 2 mg/mL proteolipozom), farklı tuz konsantrasyonları (10, 100 ve 800 mM) ve iki farklı basınçta (5 ve 10 bar) test edilmişlerdir. Tablo 4.4'te 5 bar basınçta yapılan filtrasyonlarda elde edilen tuz reddetme (J_{sr}), su ve tuz geçirgenlik değerleri (A ve B) görölmektedir. Kontrol membranlarında membran yüzeyindeki TFC reddetme tabakası yalnızca boş lipozomlar içermektedir.

Tablo 4.4: Farklı oranlarda EcAqpZ içeren membranların farklı tuz yoğunluklarında tuz reddetme kapasiteleri (R), su geçirgenlikleri ve tuz reddetme hızları (5 bar basınçta).

Proteolipozom yoğunluğunda- akuaporin çeşidi	Reddetme	Akı (Jv) (L/m ² .sa)	Tuz reddetme hızları (J _{sr}) (g/m ² .sa)	A (su geçirgenliği) (L/m ² .sa.bar)	B (tuz geçirgenliği) (L/m ² .sa)
10mM					
0.5BL⁷(kontrol)	0.76	2.47	1.43	0.49	0.76
0.5 EC⁸	0.64	7.40	3.76	1.48	4.10
1 BL (kontrol)	0.69±0.01	4.38±0.39	2.4±0.1	0.88	1.95
1 EC	0.66±0.01	4.79±0.58	2.8±0.004	0.96	2.52
2 BL (kontrol)	0.82	1.76	1.12	0.35	0.40
2 EC	0.46	4.11	1.47	0.82	4.87
100 mM					
0.5⁹BL(kontrol)	0.55	2.05	7.31	0.42	1.71
0.5 EC	0.43	5.34	14.33	1.10	7.19
1 BL (kontrol)	0.52±0.02	3.58±1.58	13.1±5.8	0.74	3.28
1 EC	0.66±0.01	4.79±0.97	13.5±2.7	0.99	2.44
2 BL (kontrol)	0.97	1.23	8.19	0.25	0.04
2 EC	0.44	3.29	9.99	0.68	4.13
800mM					
0.5 BL (kontrol)	0.40±0.001	1.24±0.007	22.18±0.57	0.33	1.88
0.5 EC	0.27±0.03	2.48±0.01	30.49±3.3	0.67	6.64
1 BL (kontrol)	0.09±0.07	1.48±0.54	6.8±6.8	0.40	14.87
1 EC	0.36±0.01	2.2±0.21	47.2±19.5	0.59	3.95
2 BL (kontrol)	0.10±0.01	0.83±0.01	3.89±0.3	0.22	7.12
2 EC	0.36±0.07	3.65±0.64	60.07±22.1	0.99	6.63

⁷ BL: Boş lipozom içeren membran

⁸ EC: *E. coli* AqpZ içeren membran

⁹ 0.5, 1 ve 2 değerleri membran yüzeyindeki akuaporin taşıyan lipozomların mg/mL olarak miktarlarını göstermektedir.

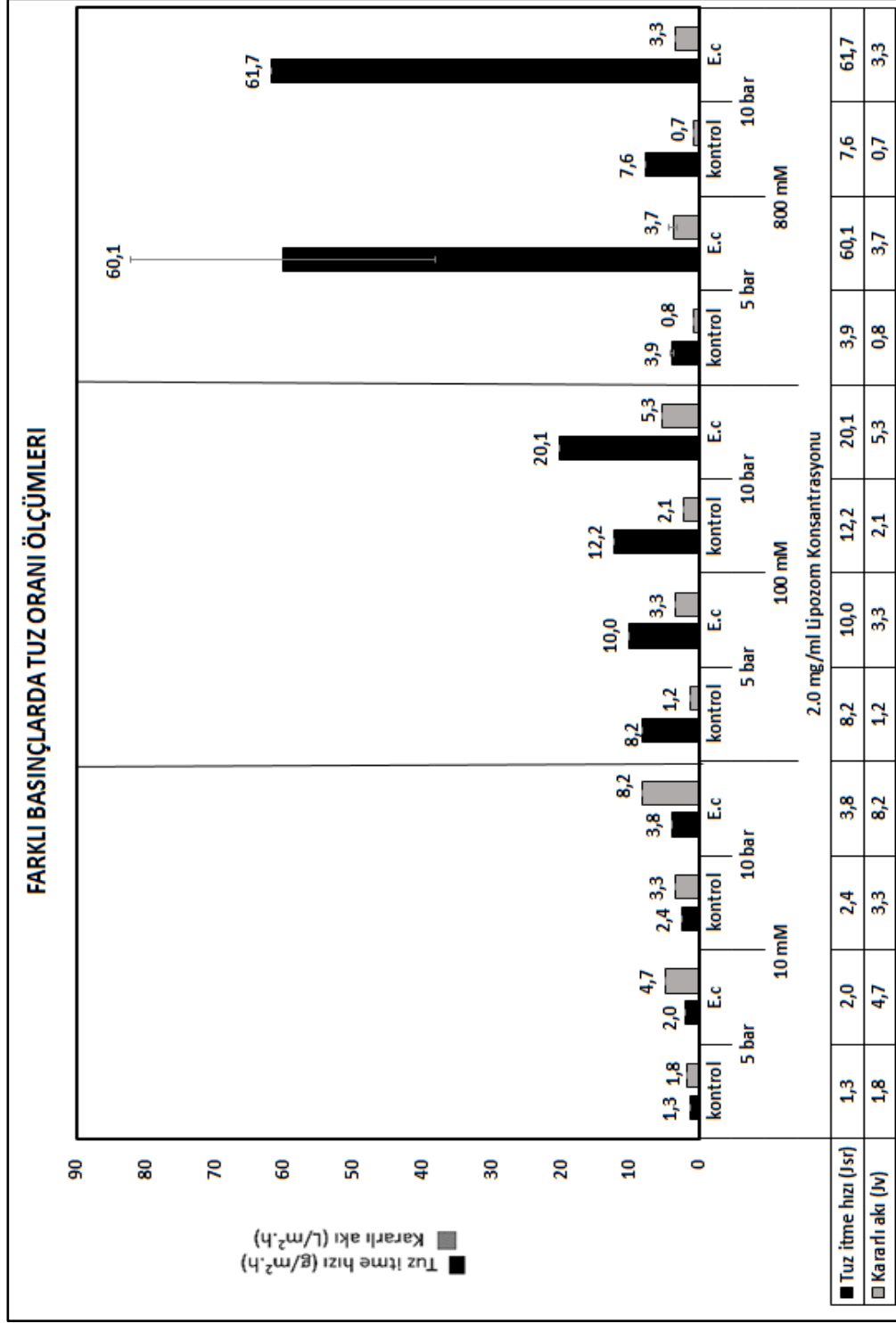
Tablolar incelendiğinde, solusyonun tuz yoğunluğu arttıkça membranların yüzde tuz reddetme (% R) kapasitelerinin ortalama % 40 düştüğü görülmektedir. 0.5 mg/ml oranında proteolipozom ile hazırlanan membranların düşük tuz yoğunluklarında tuz reddetme hızlarında (J_{sr}) diğer membranlara göre 10mM ve 100mM için sırasıyla 3.76 g/m².sa ve 14.33 g/m².sa artış görülmüştür. Yüksek tuz yoğunluğunda (800 mM) bu artış (30.49 g/m².sa) daha belirgindir. Membran yüzeyindeki proteolipozom yani akuaporin miktarının artırılması tuz reddetme kapasitesi ve tuz reddetme hızında kayda değer bir artış sağlamıştır. Proteolipozom konsantrasyonu 1 ve 2 mg/mL'ye çıkarıldığında yüksek tuz yoğunluğunda (800 mM) akuaporin içeren membranların sırasıyla 47.2 g/m².sa ve 60.07 g/m².sa daha yüksek hızda tuz ittiği görülmektedir. Membranların tuz reddetme kapasitelerinin yanısıra su ve tuz geçirgenlikleri de incelenen parametreler arasındadır. Membrane yüzeyindeki akuaporin miktarı arttıkça özellikle su geçirgenliğinde (A) artış görülmektedir. Bu sonuç hazırlanan akuaporinli membranlarla daha kısa sürede daha yüksek hacimlerde desalinasyon yapılabileceğini göstermektedir. İdeal bir desalinasyon membranının hiç tuz geçirmemesi yani B değerinin düşük olması, su geçirgenliğinin (A veya J_v değeri) ise yüksek olması beklenir. % R değeri yani tuz reddetme yüzdesi ne kadar yüksek olursa B değeri o kadar düşüktür. Ancak yüksek tuz yoğunluklarında B değeri yükselirken akı da düşmektedir.

Tablo 4.5'de 10 bar basınçta yapılan filtrasyonlarda elde edilen tuz reddetme (J_{sr}), su ve tuz geçirgenlik değerleri (A ve B) görülmektedir. Filtrasyonun yüksek basınç altında yapılması 5 bar'dan 10 bar'a yükseltilmesi düşük tuz konsantrasyonlarında tuz reddetme hızını iki katı artırmıştır ancak 800 mM tuz konsantrasyonunda akuaporinli membranın tuz reddetme hızında bir artış görülmemiştir.

Tablo 4.5: Farklı oranlarda ve EcAqpZ içeren membranların farklı tuz yoğunluklarında tuz reddetme kapasiteleri (R), su geçirgenlikleri ve tuz reddetme hızları (10 bar basınçta).

Proteolipozom konsantrasyonu-akuaporin çeşidi	Reddetme	Akı (Jv)	Tuz reddetme hızları (J_{sr})	A (su geçirgenliği)	B (tuz geçirgenliği)
10mM					
0.5BL(kontrol)	0.82	5.75	3.71	0.58	1.24
0.5 EC	0.71	11.51	6.41	1.15	4.78
2 BL (kontrol)	0.92	3.29	2.41	0.33	0.29
2 EC	0.60	8.22	3.82	0.82	5.42
100 Mm					
0.5BL(kontrol)	0.66	4.11	17.78	0.42	2.07
0.5 EC	0.48	9.86	30.99	1.00	10.59
2 BL (kontrol)	0.85	2.05	12.16	0.21	0.37
2 EC	0.54	5.34	20.10	0.54	4.49
800Mm					
2 BL (kontrol)	0.25	0.70	7.57	0.08	2.15
2 EC	0.42	3.29	61.65	0.39	4.63

Daha net bir kıyaslama yapılabilmesi açısından 2 mg/mL proteolipozom içeren membranlarla iki farklı basınçta alınan Tablo 4.4 ve 4.5 teki veriler Şekil 4.3'te grafik olarak gösterilmiştir.



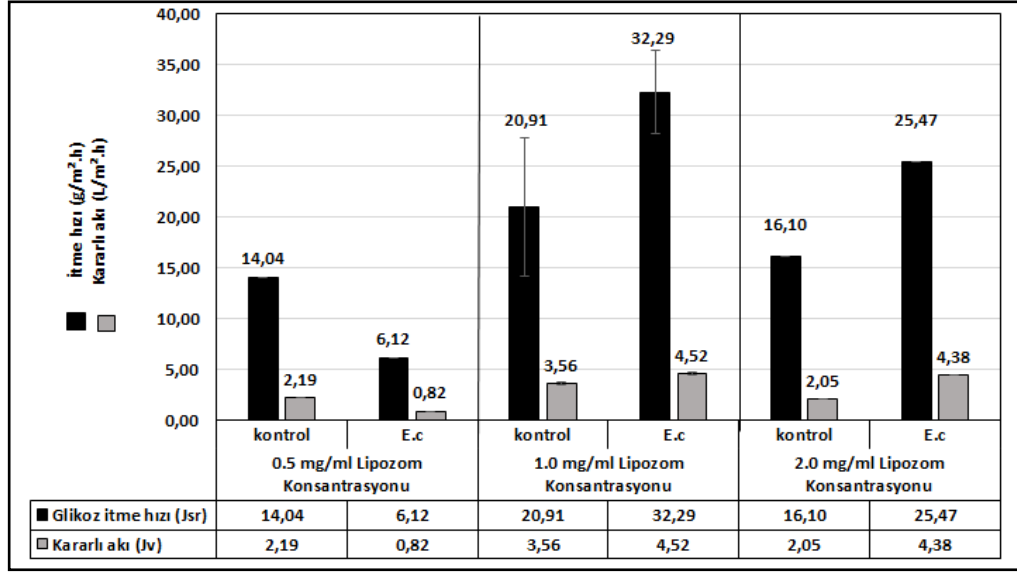
Şekil 4.3: Akuaporin (2 mg/mL) içeren membranların 5 ve 10 bar basınç uygulamasında su geçirgenlikleri ve tuz reddetme hızları.

4.4. Akuaporin İçeren Membranların Glikoz, Üre Ve Gliserol Filtrasyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

Akuaporin içeren membranların 10 g/L yoğunluğunda glikoz, üre ve gliserol özelteleri kullanıldığında çözünür bileşeni reddetme ve su geçirme kapasiteleri ölçü- uçlu filtrasyon sistemi ile test edilmiştir. Farklı akuaporin miktarlarına sahip membranların (0.5, 1 ve 2 mg/mL proteolipozomların) glikoz reddetme kapasiteleri, su ve glikoz geçirgenlikleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde membran yüzeyindeki akuaporin miktarındaki artışın glikoz reddetme hızının artmasını sağladığı görölmüşür. En yüksek değer 1 mg/mL proteolipozomla hazırlanan membran 32.3 g/m².sa görölmüşür.

Tablo 4.6: Akuaporin içeren membranların glikoz reddetme hızları.

Proteolipozom yoğunluğu - akuaporin eşidi	Reddetme (%)	Glikoz reddetme hızı (Js _r) (g /m ² .h)	Akı (Jv)	A	B
0.5BL(kontrol)	0.6	14.0	2.2	0.6	1.2
0.5 EC	0.7	6.1	0.8	0.2	0.3
1 BL (kontrol)	0.6±0.1	20.9±6.8	3.0±1.2	0.9	2.4
1 EC	0.6±0.2	32.3±4.2	4.5±0.6	1.2	2.6
2 BL (kontrol)	0.8	16.1	2.1	0.5	0.6
2 EC	0.6	25.5	4.4	1.2	3.2



Şekil 4.4: Farklı akuaporin miktarlarına sahip membranların glikoz reddetme hızları.

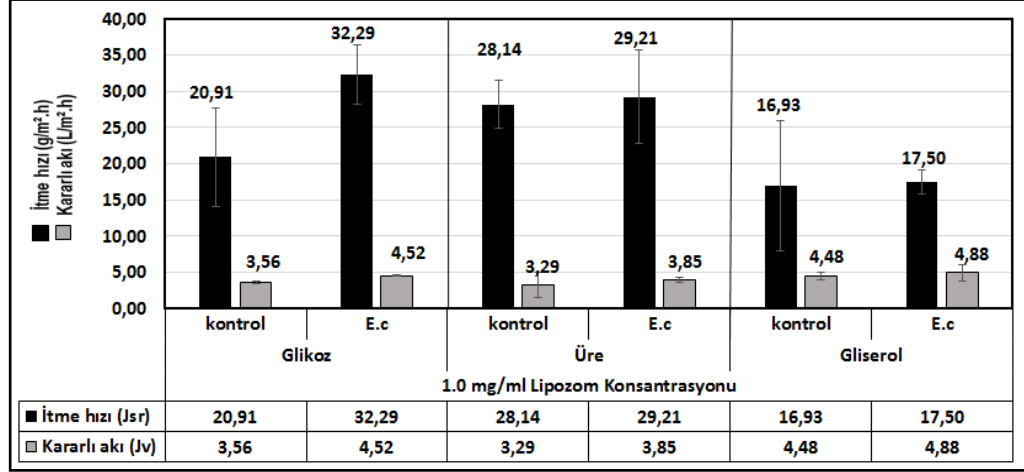
1 mg/mL proteolipozomla hazırlanan membranların üre ve gliserol için elde edilen verileri sırasıyla Tablo 4.7 ve Tablo 4.8 görülmektedir. Akuaporin membranların glikoz, üre ve gliserol reddetme kapasiteleri Şekil 4.5’de kıyaslanmıştır. GST-EcAqpZ içeren membranın glikoz gideriminde etkili olmasına rağmen üre ve gliserol filtrasyonu için elverişli olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.7: Akuaporin içeren membranların üre reddetme hızları.

Proteolipozom yoğunluğu - akuaporin çeşidi	Reddetme (%)	Üre reddetme hızı (Js) (g /m2.h)	Jv	A	B
1 BL (kontrol)	0.5±0.2	28.1±3.3	3.3±1.7	3.7	3.0
1 EC	0.5±0.04	29.2±6.5	3.9±0.4	4.4	4.5

Tablo 4.8. Akuaporin içeren membranların gliserol reddetme hızları.

Proteolipozom yoğunluğu - akuaporin çeşidi	Reddetme (%)	Gliserol reddetme hızı (Js _r) (g /m ² .h)	J _v	A	B
1 BL (kontrol)	0.5±0.1	16.9±9	4.5±0.5	2.2	4.5
1 EC	0.5±0.1	17.5±1.7	4.9±1.1	2.4	5.5



Şekil 4.5. Akuaporinli membranların glüköz, üre ve gliserol reddetme hızları (1 mg/mL proteolipozom yoğunluğunda).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

21. yüzyılın en büyük sorunlarından biri dünya nüfusunun artışıyla artan su kıtlığıdır [44] ve bu probleme karşı köklü önlemler alınması gerekmektedir. Rezervuarlara yatırım yapmak, deniz suyunu arıtmak, atık su arıtımı, bireylerin daha az su tüketmesini sağlamak, su şirketlerinin sızıntıları önlemesini sağlamak, bölgeler arasında su aktarımı yapmak ve nüfusu stabilize etmek bu önlemler arasında sayılabilir [45]. Deniz suyunun tatlı suya dönüştürülmesi için membran ve diğer nano gözenekli materyaller umut verici teknolojiler olarak görülmektedir. Yüksek basınçla çalışan ters ozmoz (RO), nano filtreleme (NF), ultra filtreleme (UF) ve mikro filtreleme (MF) ileri teknolojilerdir. Bu işlemler yüksek basınç gerektirdiği için fazla enerji gerektirir, bu da işlemin maliyetini arttırmaktadır. Maliyeti düşürmek için daha az enerjiyle daha fazla arıtım yapacak yeni membranların tasarlanması ve üretilmesi gerekmektedir.

İnce film kompozit (TFC) membranlar tipik asimetrik membranlara kıyasla daha az enerji tüketimi sağlaması, seçiciliği ve üretkenliğinin yüksek olması nedeniyle üretilmektedirler. Üç tabakadan oluşan TFC membranın gözenekli yapısının üstünde poliamid tabakası çoğunlukla m-fenilen diamin (MPD) ve trimesoil klorür (TMC), iki ana aktif monomerden oluşmaktadır. TFC membranın poliamid tabakasının yapısı optimize edilmesine rağmen yeterli su geçirgenliğine ulaşamamış bu yüzden yeni tasarımlara ihtiyaç duyulmuştur. İlk olarak Hoek ve arkadaşları 2007 yılında arayüzey polimeizasyonu işleminde poliamid reddetme tabakasına gözenekli zeolit nanopartiküller dâhil etmişlerdir. Gözenekli yapılar boyut dışlama sayesinde çözünmüş tuzları hariç tutarken hidrolik direnci düşük su yolları sağlamaktadırlar.

Akuaporinler, su moleküllerinin geçişine izin veren ve diğer tüm çözünen maddeleri reddeden nanopartiküllerdir. Akuaporin içeren TFC biyomimetrik membranların ticari RO membranlara göre daha fazla su geçirgenliği sağladığı anlaşılmıştır. Bakterilerin üretimi, istenen genin klonlanması ve protein eldesi daha kolay olduğu için akuaporin içeren biyomimetik membran üretiminde en fazla *E.coli* akuaporin Z kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda, akuaporin taşıyıcı

lipozomlar farklı metodlar ile membran yüzeyine yerleştirilebilmektedir [9], [46], [47], [48].

Bu tez çalışması kapsamında daha önce laboratuvarımızda GST tag içeren pGEX-4T-2 vektörüne klonlanmış olan *E. coli* akuaporin Z tekrar üretilmiş ve TFC membran hazırlamak amacıyla kullanılmıştır. GST yüksek protein eldesi, proteolizize direnç ve tek basamakta saflaştırma sağlaması açısından tercih edilmektedir [49]. Akuaporinler membran proteinleri oldukları için hücre içinde üretildikten sonra hücre zarına yerleşirler ve hücre zarından saflaştırılmaları gerekir. Akuaporin-Z sitoplazmaya taşan kısa N ve C terminali içerir [50]. pGEXT vektörüne klonlanan aqp genleri yaklaşık 26 kDa civarında bir GST afinite kuyruğu taşırlar. Yapılan ışık saçılım ölçümlerinde akuaporinlerin GST ile birlikte ifade edilmelerinin aktivitelerini bozmadığı tespit edilmiştir.

Saflaştırılan akuaporinler DOPC lipozomları içine yerleştirilmiş ve m-phenylene-diamine (MPD) ve trimesoyl chloride (TMC) kimyasalları ile elde edilen ince film tabakanın içine gömülerek polisulfon membranlar üzerine Zhao et al. [9] tarafından verilen yöntem kullanılarak yerleştirilmişlerdir. TMC-MPD ince film tabaka hazırlaması basit ve ekonomik bir yöntemdir. Ayrıca mekanik stabilitesi yüksek olduğu rapor edilmiştir [47]. Akuaporin içeren membranlar hazırlanırken akuaporinlerin lipozomlar içine yerleştirilmeleri proteinlerinin hücre zarındaki doğal konformasyonlarında bulunmalarını sağlamaktadır.

İyi bir desalinasyon membranının tablolarda gösterilen tuz reddetme (R) ve su geçirme özellikleri membranın değerlendirilmesinde kullanılan en önemli parametlerdir. İdeal bir membran yüksek akı ve yüksek tuz reddetme kapasitesine sahip olmalıdır. Bu proje kapsamında üretilen membranları değerlendirecek olursak R yani tuz reddetme değerleri farklılık göstermekle birlikte *E. coli* AqpZ içeren mebranların akılarının oldukça yüksek olduğu farkedilmiştir.

Deniz tuzu konsantrasyonuna yakın bir değer olan 800 mM tuz konsantrasyonuna sahip solusyon filtre edildiğinde akuaporin içeren membranların R değerleri (tuz reddetme değeri) akuaporin içermeyen control (BL) membranına kıyasla 3.6 katı daha yüksek bulunmuştur.

Literatüre bakıldığında desalinasyon membranlarının 10 mM veya 100 mM gibi daha düşük tuz konsantrasyonlarında test edildiği görülmektedir. Bu tez

çalışmasında *E. coli* akuaporin membranlardan 10, 100 ve 800 mM tuz konsantrasyonuna sahip solusyonlar farklı basınçlarda süzölmöştür. *E. coli* akuaporin taşıyan membranların performansında 10 ve 100 mM tuz konsantrasyonlarında farkedilir bir iyileşme görölmezken, 800 mM tuz konsantrasyonunda membranların tuz reddetme kapasitelerinin kontrole kıyasla yüksek olduğu görölmöştür. Akuaporinli membranların su akılarının yüksek olması nedeniyle saatte birim yüzeyden itilen tuz miktarının da oldukça yüksek olduğu görölmöştür. Biyomimetik membranların sahip olduğu bu su kanalları su akısının yükselmesini sağlayarak membranların birim zamanda daha fazla tuz reddetmesine neden olmaktadır.

Akuaporin yerleştirilmiş membranlarla yapılan filtrasyon sonuçlarına bakıldığında membranda akuaporin miktarı artırıldıkça su geçişinin (A) hızlandığını göstermiştir. Su geçişinin hızlı olması birim zamanda itilen tuz miktarının da fazla olmasını sağlamaktadır. Tablolar incelendiğinde akuaporin içeren membranlarda birim zamandaki su akısı ve tuz reddetme hızlarının yüksek olduğu görölür. Ancak su akısının hızlanması % reddetme değeriinde düşüşe neden olmaktadır. Dolayısıyla filtrasyondaki tuz miktarı yani tuz geçirgenliği de artmaktadır. İdeal bir membranda su akısının yüksek olması tuz geçirgenliğinin ise düşük olması istenmektedir. Bu değerler tuz reddetme tabakası olan ince film tabakanın sağlamlığından ve ölü uçlu filtrasyon sistemindeki basınçlı ortamdaki etkilenebilmektedir. Özellikle yüksek tuz konsantrasyonuna (800 mM) sahip solusyon süzöldüğünde hazırlanan membranların tuz geçirgenliği değeri (B değeri) yüksek bulunmuştur. Membran yüzeyinde oluşan konsantrasyon polarizasyonu B değeriinin yükselmesinin en önemli nedeni olarak görölmektedir.

AQP ailesinin bazı üyeleri, yüksek su taşıma oranlarında bile üre, gliserol ve glikoz gibi küçük çözünenler için mükemmel çözüme tutma yeteneklerine sahiptir [51], [52]. Kumar ve arkadaşları AqpZ-ABA membranının tuz, glukoz, üre ve gliserol gibi küçük çözünen maddeler üzerindeki su için seçiciliği gösterilmiştir [38]. Tasarlanan AqpZ-DOPC membranlar aynı zamanda gliserol, glukoz ve ürenin filtrasyonu amacıyla da kullanılmıştır. *E.coli* Aqp-Z içeren membranların lipozom içeren membranlardan reddetme kapasitelerinin yaklaşık aynı olduğu gözlenmiştir. Yoon ve arkadaşları süzöntü akısının ters ozmoz ve nanofiltrasyon membranlarda ürenin tuzdan daha fazla hızda süzdüğü gözlenmiştir [53]. Yapılan çalışmada *E. coli*

akuaporini ile hazırlanan membranların-glikoz, üre ve gliserol için tuzdan daha hızlı süzdüğü gözlenmiştir. Bu tez kapsamında geliştirilen *E. coli* akuaporini içeren membranlar yüksek tuz konsantrasyonunda tuz reddetme kapasiteleri (R değerleri) yaklaşık % 35 civarında seyretmektedir. Membranların deniz suyunun hızlı bir şekilde tuzsuzlaştırılmasında kullanım potansiyeli yüksektir. Deniz suyunun % 99 oranında tuzdan arındırılabilmesi için bu tez çalışmasında üretilen biyomimetik membranlar seri halinde çalıştırılabilir. Tez çalışması kapsamında membran yüzeyine yerleştirilen akuaporin miktarı artırıldığında su akısının yükselmesine karşın tuz reddetme değerinde fazla düşüş olmadığı görülmüştür. Bu sonuç akuaporinlerin suyu geçişine izin verirken tuz moleküllerini geçirmediğini göstermektedir. Bu çalışmada akuaporinlerin biyomimetik membran tasarımında kullanılabilecek ideal ajanlar olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Ang W.L., Mohammad A.W., Hilal N., Leo C.P., (2015), "A review on the applicability of integrated/ hybrid membrane processes in water treatment and desalination plants", *Desalination*, 363, 2–18.
- [2] Elimelech M., Phillip W.A., (2011), "The future of seawater desalination: Energy, Technology, And the Environment", *Science*, 333, 712–717.
- [3] Yuan H., He Z., (2015), "Integrating membrane filtration into bioelectrochemical systems as next generation energy-efficient wastewater treatment technologies for water reclamation: a review", *Bioresource Technology*, 195, 202–209.
- [4] Yin J., Deng B., (2015), "Polymer-matrix nanocomposite membranes for water treatment", *Journal Membrane Science*, 479 256–275,
- [5] Xu R., Wang J., Kanezashi M., Yoshioka T., Tsuru T., (2011), "Development of robust organosilica membranes for reverse osmosis", *Langmuir*, 27, 13996–13999.
- [6] Xu G., Wang J., Li C., (2013), "Strategies for improving the performance of the polyamide thin film composite (PA-TFC) reverse osmosis (RO) membranes: surface modifications and nanoparticles incorporations", *Desalination*, 328, 83–100.
- [7] Kong C., Koushima A., Kamada T., Shintani T., Kanezashi M., Yoshioka T., Tsuru T., (2011), "Enhanced Performance Of Inorganic-Polyamide Nanocomposite Membranes Prepared By Metal-Alkoxide-Assisted Interfacial Polymerization", *Journal Membrane Science*, 366, 382–388.
- [8] Alleva K., Chara O., Amodeo G., (2012), "Aquaporins: another piece in the osmotic puzzle", *FEBS Letters*, 586, 2991-2999.
- [9] 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.
- [10] Belessiotis V., Kalogirou S. ve Delyannis E., (2016), "Thermal Solar Desalination Methods and Systems", Elsevier
- [11] Web 1, (2019), <https://ensia.com/features/can-saltwater-quench-our-growing-thirst>, (Erişim Tarihi 11/02/2019)

- [12] Water Desalination Report, (2010-2011), IDA Desalination Yearbook, Media Analytic Ltd., Oxford, UK
- [13] Li X., Chou S., Wang R., Shi L., Fang W., Chaitra G., Tang C.Y., Torres J., Hu X., Fane A.G., (2015), "Nature gives the best solution for desalination: aquaporin-based hollow fiber composite membrane with superior performance", Journal Of Membrane Science, 494, 68–77.
- [14] Kilickaplan A., Bogdanov D., Pekero O., Caldera U., Aghahosseini A., (2017), "An energy transition pathway for turkey to achieve 100% renewable energy powered electricity, Desalination And Non-Energetic Industrial Gas Demand Sectors By 2050", Solar Energy, 158, 218–23.
- [15] Caldera U., Bogdanov D., Breyer Ch., (2016), "Local cost of seawater RO desalination based on solar PV and wind energy: a global estimate", Desalination, 385, 207–216.
- [16] Taşıyıcı S., (2009), "Batık Membran Sistemleri İle İçme Suyu Arıtımı: Membran Tıkanıklığını Azaltmak İçin Farklı Yöntemlerin Kullanılması", İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi , İstanbul.
- [17] Lofrano G., Brown J., (2009), "Wastewater Management Through the Ages: A History of Mankind", University of Salerno, Department of Civil Engineering, Via Ponte Don Melillo, Fisciano (SA), Italy.
- [18] Türker M., (2003), "Anaerobik Biyoteknoloji: Türkiye ve Dünya'daki Eğilimler", 2. Ulusal Çevre Kirliliği Kontrolü Sempozyumu, 22-24 Ekim, ODTÜ.
- [19] Yıldız S., Namal O.Ö, Çekim M., (2013), "Atık Su Arıtma Teknolojilerindeki Tarihsel Gelişimler", Selçuk Üniversitesi Mühendislik, Bilim ve Teknoloji Dergisi, 2147-9364.
- [20] Aslan M., (2012), "Anaerobik Batık Membran Bioreaktörde Membran Modül Geometrisi Ve Biyogaz Geri Devrinin Membran Kirlenmesine Etkisi", FÜ., Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı , Doktora Tezi, Elazığ.
- [21] Droste L., (1997), "Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment, Michigan University Publications", USA.
- [22] Kitiş M., Köseoğlu H., Gül N., Ekinci F.Y., (2003), "Atık Su Arıtımı ve Geri Kazanımında Membran Bioreaktörleri", V. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, TMMOB-ÇMO, Ankara.
- [23] Lonsdale H.K., (1982), "The growth of membrane technology", Journal of Membrane Science, 10, 81–181.

- [24] Singh R., (2015), "Membrane Technology and Engineering for Water Purification Application, Systems Design and Operation", Second Edition, Elsevier.
- [25] Aslan M., (2016), "Membran Teknolojileri", 1.Baskı, Türkiye Çevre Koruma Vakfı.
- [26] AWWA (American Water Works Association) Manuel (2007), Reverse Osmosis and Nanofiltration, AWWA.
- [27] Shilton S.J., Ismail A.F., Gough P. J., (1997), "Molecular Orientation and The Performance of Synthetic Polymeric Membranes for Gas Separation", Polymer, 38: 9, 2215-2220.
- [28] Koyuncu İ., (2018), "Su/Atık su Arıtılması ve Geri Kazanılmasında Membran Teknolojileri ve Uygulamaları, Cilt 1: Membran Teknolojileri Ve Su Arıtma", 1.Baskı, Yıldızlar Ofset Mat. Yay. Rek. İç Dış Tic. Ltd.Şti.
- [29] Maruf S.H, Ahn D.U., Pellegrino J., Killgore J.P., Greenberg A.R., Ding Y., (2012), "Correlation between barrier layer tg and a thin-film composite polyamide membrane's performance: Effect Of Chlorine Treatment", Journal Of Membrane Science, 405 - 167.
- [30] Baker R.W., (2004), "Membrane Technology and Applications", 2nd Ed. Johnwiley & Sons, Ltd., New York.
- [31] Lau W.J., Ismail A.F., Misdan N., Kassim M.A.,(2012), "A recent progress in thin film composite membrane: a review", Desalination, 287, 190–199.
- [32] Yanga Z., Maa X.H., Tanga C.Y., (2018), "Recent development of novel membranes for desalination", Desalination 434, 37–59
- [33] Jeong B.H., Hoek E.M., Yan Y., Subramani A., Huang X., Hurwitz G., Ghosh A.K. and Jawor A., (2007) "Interfacial polymerization of thin film nanocomposites: a new concept for reverse osmosis membranes", Journal Of Membrane Science, 294, 1–7.
- [34] Yin J., Kim E.S., Yang J. And Deng B., (2012), "Fabrication of a novel thin-film nanocomposite (TFN) membrane containing MCM-41 silica nanoparticles (Nps) for water purification", Journal of Membrane Science, 423, 238–246.
- [35] Kozono D., Yasui M., King L.S. And Agre P., (2002), "Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine", Journal of Clinical Investigation, 109, 1395–1399.

- [36] Mathai J.C., Tristram-Nagle S., Nagle J.F., Zeidel M.L., (2008), "Structural determinants of water permeability through the lipid membrane", *The Journal of General Physiology*, 131, 69–76.
- [37] Hovijitra N.T., Wu J.J., Peaker B. and Swartz J.R., (2009), "Cell-free synthesis of functional aquaporin z in synthetic liposomes", *Biotechnology and Bioengineering*, 104, 40–49.
- [38] 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, 20719–20724.
- [39] Agre P., (2004), "Aquaporin water channels", *Bioscience Reports*, 24, 127–163.
- [40] Qi S., Wang R., Chaitra G.K.M, Torres J., Hu X., Fane A.G., (2016), "Aquaporin-based biomimetic reverse osmosis membranes: stability and long term performance", *Journal Of Membrane Science*, 508, 94–103.
- [41] Web2, (2019),<http://Www.Wikizero.Biz/İndex.Php?Q=Ahr0chm6ly90ci53awtpcgvkaweub3jnl3dpa2kvrnxjagvyawnoawfffy29saq>, (Erişim Tarihi 14/01/2019)
- [42] Erbakan M., Shen Y.X., Grzelakowski M., Butler P. J., Kumar M., Curtis W. R., (2014), "Molecular cloning, overexpression and characterization of a novel water channel protein from rhodobacter sphaeroides", *Plos One*, 9.
- [43] Web3, (2019),[https://Chem.Libretxts.Org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/13_Kinetic_Methods/13.2%3A_Chemical_Kinetics](https://Chem.Libretxts.Org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/13_Kinetic_Methods/13.2%3A_Chemical_Kinetics) ,(Erişim Tarihi 14/01/2019)
- [44] Seckler D., Barker R., Amarasinghe U., (1999), "Water scarcity in the twenty-first century", *International Journal of Water Resources Development*, 15, 29–42.
- [45] Web4, (2019),https://Www.Bbc.Com/Turkce/Haberler/2012/04/120406_Water_Shortage, (Erişim Tarihi 17/01/2019)
- [46] Li X., Wang, R., Wicaksana F., Tang C., Torres J. and Fane AG., (2014), "Preparation of high performance nanofiltration (NF) membranes incorporated with aquaporin Z", *Journal of Membrane Science*, 450, 181-188.
- [47] Wagh P., Parungao G., Viola R.E. and Escobar I.C., (2015), "A new technique to fabricate high-performance biologically inspired membranes for water treatment", *Separation and Purification Technology*, 156, 754-765.
- [48] Xie W., He F., Wang B., Chung T.S., Jeyaseelan K., Armugam A. and 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.

- [49] Harper S. and Speicher D.W., (2001), “Expression and Purification of GST Fusion Proteins”, *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 6: Unit 6.6.
- [50] Borgnia M.J., Kozono D., Calamita G., Maloney P.C. and Agre P., (1999), “Functional reconstitution and characterization of aqpz, the e. coli water channel protein1”, *Journal of Molecular Biology*, 291(5): 1169-1179.
- [51] Grumezescu A., (2016), “Water Purification (Nanotechnology in The Agri-Food Industry)”, 1st Edition, Kindle Edition.
- [52] Stein W.D., Zeuthen T., (2002), “Molecular Mechanisms of Water Transport Across Biological Membranes: Volume 215 (International Review of Cell and Molecular Biology)”, 1. Edition, Academic Press.
- [53] Yoon Y., Lueptow R.M., (2005), “Removal of Organic Contaminants by RO and NF Membranes”, *Journal of Membrane Science*, 261, 76–86.
- [54] Sun G., Chung T.S., Jeyaseelan K., and Armugam A., (2013), “Stabilization and immobilization of aquaporin reconstituted lipid vesicles for water purification”, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 102, 466–471.
- [55] Zhong P.S, Chung T.S., Jeyaseelan K., and Armugam A., (2012), “Aquaporin-embedded biomimetic membranes for nanofiltration”, *Journal of Membrane Science*, 407, 27–33.
- [56] Wang M., Wang Z., Wang X., Wang S., Ding W., Gao C., (2015), “Layer-by-layer assembly of aquaporin z-incorporated biomimetic membranes for water purification”, *Environmental Science & Technology*, 49, 3761–3768.
- [57] Birol N.G., (2017), “Escherichia Coli Su Transfer Proteini (Aquaporin) Kullanılarak Membran Yapısının Geliştirilmesi ve Su Geçirme Kapasitesinin İyileştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [58] Calamita G., Bishai W. R., Preston G. M., Guggino W. B., and Agre P., (1995), "Molecular cloning and characterization of aqpz, a water channel from escherichia coli", *Journal Of Biological Chemistry*, 270 (49), 29063-29066.
- [59] Lian J., Ding S., Cai J., Zhang D., Xu Z., and Wang X., (2009), "Improving aquaporin z expression in escherichia coli by fusion partners and subsequent condition optimization", *Applied Microbiology And Biotechnology*, 82 (3), 463-470.

- [60] Xu Z., Lian J., Cai J., (2010), "Efficient expression of aquaporin z in escherichia coli cell-free system using different fusion vectors", Protein And Peptide Letters, 17 (2), 181-185.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşenur ÖZTÜRK 1992 yılında Sakarya’da doğdu. 2010 yılında başladığı Gazi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümünü 2016 yılında tamamladı. 2017 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans eğitimini 2019 yılında başarıyla tamamladı.

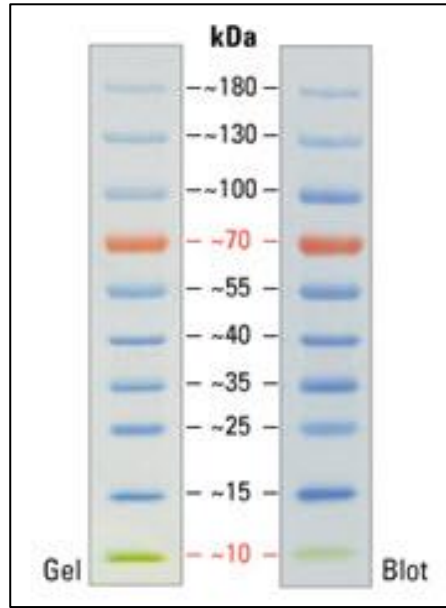
EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

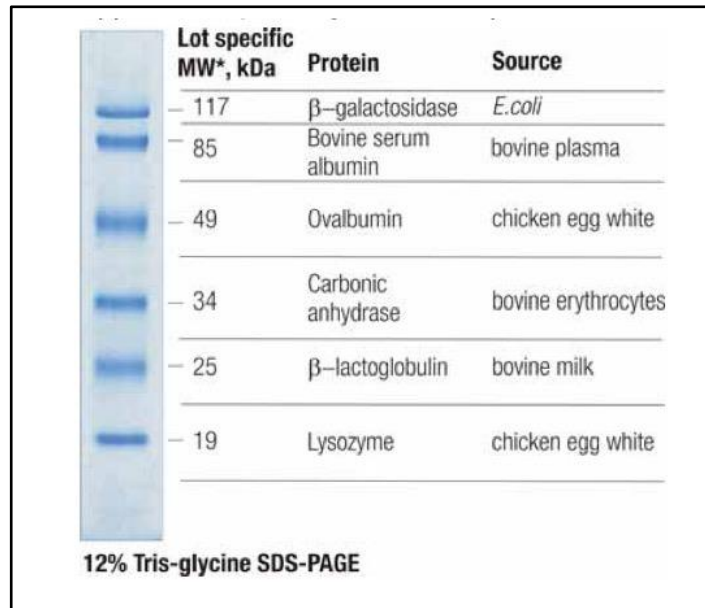
Çalıcıoğlu N.G., Özdemir G.Ö, Öztürk A., Yıldız A., Yılmaz H., Ergenekon P., Erbakan M., Erhan E., ve Özkan M., (2018), “Use of halophilic aquaporin for preparation of biomimetic thin film composite membrane”, Journal Of Membrane Science, 568 105–112.

Ozturk A., Yıldız A., Yılmaz H., Ergenekon P., and Ozkan M., (2018), “Effect of proteoliposome concentration on salt rejection rate of polysulfone membrane prepared by incorporation of escherichia coli and halomonas elongata aquaporins”, World Academy Of Science, 12, 5.

Ek B: Diğer Ekler



Şekil B1.1: Thermofischer protein merdiveninin çizelge sayfası.



Şekil B1.2: Fermentas MW Markerini Proteini